

ANDRÉ OSTRENSKY

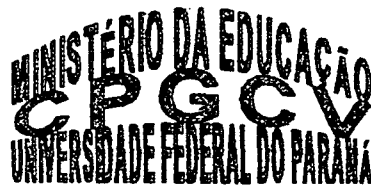
**EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE  
CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE DE VACAS  
DA RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre. Curso de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor  
de Ciências Agrárias, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. José Sidney Flemming

CURITIBA

1999



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, **ANDRÉ OSTRENSKI** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o grau “ 4 ” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Produção Animal.

Curitiba, 14 de dezembro de 1999.



Prof. Dr. JOSÉ SIDNEY FLEMMING  
Presidente/Orientador



Prof. Dr. HUMBERTO GONZALO MONARDES  
Membro



Dr. RÜDIGER DANIEL OLLHÖFF  
Membro

**ANDRÉ OSTRENSKY**

**EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE  
CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE DE VACAS DA  
RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ**

**Dissertação elaborada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, com a Comissão de orientação formada pelos professores:**

**Prof. José Sidney Flemming                      -            Orientador**  
**Setor de Ciências Agrárias, UFPR**

**Prof. Newton Pohl Ribas                         -            Co-orientador**  
**Setor de Ciências Agrárias, UFPR**

**Prof. Humberto Gonzalo Monardes         -            Co-orientador**  
**Dep. Animal Science, McGill University**

A Deus, pela vida, pela saúde e força de vontade...

## **AGRADEÇO**

Aos meus pais, Eugênio (*in memoriam*)

e Leda, pela formação do meu caráter...

## **OFEREÇO**

À Luciene

pelo amor, incentivo e paciência...

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que participaram do desenvolvimento desta pesquisa, que embora conste em meu nome, é fruto do trabalho de muitas pessoas.

Ao pessoal da Cooperativa Witmarsum, Edilson, Reinaldo, Dario, Paulo, Pedro Sérgio, Gunther, Robson, Reinaldinho, Uziara, Mari, Antonio e tantos outros, por todo o apoio naquele momento tão difícil de minha vida e no retorno à Colônia.

Ao Ronei Volpi, pela confiança em meu trabalho e oportunidades com o Senar.

Aos amigos Almiro, Altivo e Sebastião, pela acolhida e pela compreensão.

À Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, pela cessão do banco de dados e apoio operacional à pesquisa.

A todos os amigos da Associação, Darci, José Augusto, Giacomazzi, Alessandra, Adriano, Mauricinho, Rafael, Clebson, Marcos, Fabiana, Waleska, que me agüentaram e cuja atuação foi fundamental para a conclusão deste.

Ao Cláudio Nápolis Costa, da Embrapa – CNPGL, ao Marcos Deon e à Monica L. Oliveira, pelo apoio técnico ao projeto.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, em nome de seu Coordenador, Prof. Luis Ernandes Kozicki, pela dedicação ao Curso e ao Professor Metry Bacila, pelo inestimável trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, João Ari, Télió, James, José Rui, Cris, Valéria, Polly, Karin, Gelinski, Capovilla, Elaine, Fabíola, Sílvio, Leandro, Mara e a todos os outros, pelas festas, pela amizade.

Ao Sérgio Bajaluk, pela inquietude e por dividir as aflições.

Aos amigos Rodrigo Mira e Cláudia Pimpão, pela amizade e companheirismo.

Ao Rodrigo de Almeida, pela orientação, pela inestimável ajuda e amizade.

Ao Prof. José Sidney Flemming, pela amizade, pelo apoio, pela confiança em mim depositada e pela orientação.

Ao Prof. Humberto Monardes, pela extrema paciência do Mestre com seu aprendiz, pela sua serenidade e valorosa orientação.

Ao Prof. Newton Pohl Ribas, por acreditar no meu potencial, naquele momento da minha vida onde havia muita incerteza, conferindo a mim a imensa responsabilidade de trabalhar com este banco de dados. Muito obrigado pela amizade, pela oportunidade e pela orientação.

À maravilhosa família que Deus me deu, de quem tenho tanto orgulho e exemplos a seguir, à minha mãe Leda, aos meus irmãos Antonio e Eunice, à Débora, meu sobrinho e afilhado Vítor e à minha avó Eunice ( *in memoriam*).

À Luciene, pelo amor e amizade absolutamente incondicionais.

Com especial carinho, agradeço ao meu pai Eugênio, pela educação e cujas palavras de apoio e sabedoria carregarei sempre comigo.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1 CONTROLE LEITEIRO .....	5
2.2 MASTITE BOVINA .....	8
2.2.1 DEFINIÇÃO .....	8
2.2.2 PERDAS ECONÔMICAS .....	10
2.2.3 DIAGNÓSTICO .....	16
2.2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	18
2.3 EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	20
2.3.1 INFECÇÃO .....	20
2.3.2 FREQUÊNCIA DE ORDENHA .....	22

2.3.3	IDADE DA VACA AO PARTO .....	23
2.3.4	ESTAÇÃO DE PARTO .....	25
2.3.5	ANO DE CONTROLE .....	26
2.3.6	ESTÁGIO DE LACTAÇÃO .....	27
2.3.7	IDADE DA AMOSTRA .....	28
2.3.8	EFEITO DE VACA .....	30
2.3.9	REGIÃO GEOGRÁFICA .....	31
2.3.10	REBANHO .....	32
2.3.11	GRAU DE SANGUE .....	33
2.3.12	FATORES NUTRICIONAIS E MASTITE .....	33
2.3.13	OUTROS EFEITOS .....	40
2.4	TRANSFORMAÇÃO LOGARÍTMICA DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	44
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
3.1	MEDIDAS DESCRITIVAS .....	50
3.2	PREPARAÇÃO DOS DADOS .....	54
3.3	MÉTODOS DE ANÁLISE .....	56
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
4.1	MEDIDAS DESCRITIVAS .....	62
4.2	EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	65



4.2.1	FREQÜÊNCIA DE ORDENHA .....	66
4.2.2	IDADE DA VACA AO PARTO, POR ORDEM DE LACTAÇÃO .....	67
4.2.3	ESTAÇÃO DE PARTO .....	72
4.2.4	ANO E MÊS DE CONTROLE .....	74
4.2.5	DIAS EM LACTAÇÃO .....	84
4.2.6	IDADE DA AMOSTRA .....	87
4.2.7	EFEITO DE VACA .....	90
4.2.8	USO DAS TRANSFORMAÇÕES LOGARÍTMICAS DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	91
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>

## LISTA DE TABELAS

01 –	PRODUÇÃO TOTAL DE LEITE DOS PRINCIPAIS PAÍSES, EM 1998 E 1999 E A EVOLUÇÃO NO PERÍODO .....	96
02 –	ESTIMATIVAS DAS DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO DE LEITE NA LACTAÇÃO ASSOCIADAS À VARIAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	97
03 –	RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), O <i>CALIFORNIA MASTITIS TEST</i> (CMT), O <i>WISCONSIN MASTITIS TEST</i> (WMT) E ESTIMATIVAS DE PERDAS DE PRODUÇÃO DE LEITE .....	98
04 –	ESCORE LINEAR E A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....	98
05 –	ALTITUDE E CLIMA DAS ESTAÇÕES METEOROLÓGICAS DO IAPAR, CORRESPONDENTES ÀS BACIAS LEITEIRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO .....	99
06 –	TEMPERATURAS MÉDIAS MÁXIMAS E MÍNIMAS EM ESTAÇÕES METEOROLÓGICAS DO IAPAR, CORRESPONDENTES ÀS BACIAS LEITEIRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO .....	99
07 –	PRECIPITAÇÕES PLUVIOMÉTRICAS MÉDIAS MÁXIMAS, MÍNIMAS E TOTAL EM ESTAÇÕES METEOROLÓGICAS DO IAPAR, CORRESPONDENTES ÀS BACIAS LEITEIRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO .....	100
08 –	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS, NÚMERO DE OBSERVAÇÕES UTILIZADAS E NÚMERO E PERCENTAGENS DE OBSERVAÇÕES ELIMINADAS PELAS RESTRIÇÕES APLICADAS AO ARQUIVO DE DADOS ORIGINAL .....	100

09 – VALORES MÉDIOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) EM DIFERENTES PAÍSES, SEGUNDO DIVERSOS AUTORES .....	62
10 – MÉDIAS REAIS E DESVIOS-PADRÃO (D.P.) DE MEDIDAS DESCRITIVAS, DE 640.937 CONTROLES MENSIS DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ .....	63
11 – RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS) NO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ .....	66
12 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO A ESTAÇÃO DE PARTO .....	72
13 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) SEGUNDO O ANO E MÊS DE CONTROLE .....	75
14 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) SEGUNDO O ANO E MÊS DE CONTROLE .....	76
15 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS) SEGUNDO O ANO E MÊS DE CONTROLE .....	77
16 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO O MÊS DE CONTROLE .....	79
17 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO O ANO DE CONTROLE .....	82

18 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO AS CLASSES DE DIAS EM LACTAÇÃO .....	85
19 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO A IDADE DA AMOSTRA DE LEITE, EM DIAS .....	88

## LISTA DE FIGURAS

01 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS DE PRIMEIRA LACTAÇÃO .....	68
02 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS DE SEGUNDA LACTAÇÃO .....	69
03 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS DE TERCEIRA LACTAÇÃO .....	69
04 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS DE QUARTA LACTAÇÃO .....	70
05 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS DE QUINTA À DÉCIMA LACTAÇÕES .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	-	ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CRIADORES DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA
CCS	-	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS
CV	-	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
DP	-	DESVIO-PADRÃO
ECS	-	ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS
GSH-Px	-	GLUTATION-PEROXIDASE
L2CS	-	LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS
NAGase	-	N-ACETIL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE
MS	-	MATÉRIA SECA
NMC	-	<i>NATIONAL MASTITIS COUNCIL</i>
NRC	-	<i>NATIONAL RESEARCH COUNCIL</i>
ns	-	NÃO SIGNIFICATIVO
PARLPR	-	PROGRAMA DE ANÁLISE DE REBANHOS LEITEIROS DO PARANÁ
PMN	-	POLIMORFONUCLEAR
R <sup>2</sup>	-	COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO
SOD	-	SUPERÓXIDO-DISMUTASE

## RESUMO

A contagem de células somáticas (CCS) no leite é uma medida indireta da presença de infecção subclínica na glândula mamária de fêmeas bovinas, podendo ser utilizada para programas de controle de mastite, de pagamento de leite por qualidade e como parâmetro para legislação sanitária, entre outros. O presente estudo visou decompor os efeitos de alguns fatores de ambiente sobre a CCS, sobre o escore de células somáticas (ECS) e sobre o logaritmo de células somáticas (L2CS); estimar os componentes de variância para estas características; e ainda, comparar o ECS e o L2CS com a CCS em amostras de leite. Um arquivo de dados contendo 640.937 observações do controle mensal, de lactações encerradas, originárias de 40.333 vacas, distribuídas em 378 rebanhos associados ao Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR) da APCBRH, compreendidas entre janeiro de 1994 e dezembro de 1998, foi analisado. Empregou-se o Método dos Quadrados Mínimos, utilizando-se o procedimento PROC GLM, do SAS, para o estudo dos seguintes efeitos fixos: frequência de ordenha, idade da vaca ao parto, estação de parto, mês e ano de controle, dias em lactação e idade da amostra. As médias e os respectivos desvios-padrão para a CCS, o ECS e o L2CS foram:  $556.626 \pm 835.004$  células/mL,  $4,461 \pm 1,789$  e  $8,105 \pm 1,789$ . Todos os efeitos incluídos no modelo foram importantes fontes de variação ( $P < 0,01$ ) sobre as três características estudadas, exceto estação de parto sobre a CCS e frequência de ordenha sobre as três variáveis ( $P > 0,05$ ). Foram observados resultados mais concisos para o ECS e para o L2CS do que para a CCS na população estudada.

**Palavras-chave:** Bovinos leiteiros, contagem de células somáticas, escore de células somáticas, fatores de ambiente, logaritmo de células somáticas, mastite, Paraná, raça Holandesa.

## ABSTRACT

Somatic cell count in milk (SCC) indicates the presence of intramammary infection in cows. So it may be used on mastitis control, on payment systems based on milk quality and on udder health diagnosis. The goal of this study was to evaluate the effects of some environmental factors on milk SCC, on somatic cell score (SCS) and on somatic cell logarithmic transformation (SCL). A data set containing 640,937 monthly test-day records from 40,333 Holstein cows distributed in 378 supervised herds from Holstein Association from Parana State, Brazil, covering a period from January 1994 to December 1998 was analyzed. General Linear Model procedures (SAS, v. 6.12, 1991) were used for the study of the following fixed effects: age of cow at calving, calving season, month-year of test, days in milk, milking frequency and age of the sample. Means and standard deviations of SCC, SCS and SCL were  $556,626 \pm 835,004$  cells/ml,  $4.461 \pm 1.789$  and  $8.105 \pm 1.789$ , respectively. All the factors included in the model had a highly significant ( $P < 0.01$ ) effect on the three traits analyzed, except calving season on SCC and milking frequency on all three traits ( $P > 0.05$ ). The trends suggest a steady improvement on the somatic cell count with time. It was also observed clearer results from the two transformed traits (SCS and SCL) than from SCC.

**Key Words:** Dairy cattle, environmental factors, Holstein cows, mastitis, milk, Parana State, somatic cell count, somatic cell logarithm, somatic cell score



## 1 INTRODUÇÃO

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estimou que a produção mundial de leite, em 1998, foi de 384,89 bilhões de litros de leite, representando um aumento de 0,9% em relação ao ano anterior (SEAB-DERAL, 1999).

Na Tabela 01, observa-se que os Estados Unidos é o maior produtor mundial de leite, com 71,37 bilhões de litros, em 1998. O Brasil ocupa a sexta posição no ranking, com 20,08 bilhões de litros e vem apresentando taxas de crescimento na ordem de 4,0% a 6,0%, em função do aumento da demanda interna. Mesmo assim, a produção nacional não é suficiente para atender o mercado interno e o volume de importações de produtos lácteos, naquele mesmo ano, atingiu 2,22 bilhões de litros (JANK et al., 1999).

O Paraná é o quinto maior produtor nacional, com 1,85 bilhões de litros, após Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e São Paulo, respondendo, por 8,42% da produção nacional. Para 1999, espera-se um aumento de 5,4% na produção do Estado (SEAB-DERAL, 1999).

O sistema agroindustrial do leite no Brasil vem passando por drásticas mudanças desde o início dos anos 90. Observa-se, desde então, uma diferenciação nos preços da matéria-prima, intensa concorrência no varejo com forte participação de empresas multinacionais, redução do número de produtores, aumento – ainda

que pequeno – da produtividade animal, crescimento acentuado do mercado informal e graves problemas de qualidade do produto.

A produção de leite no país caracteriza-se por grande número de animais (19.000.000 de vacas), a maioria de raças mestiças, não especializadas, de pequenos produtores (média de 50 L/produtor/dia), baixa produtividade (1.167 L/vaca/ano) e baixa qualidade do produto final nas fazendas (LARANJA DA FONSECA, 1997; JANK et al., 1999). A média de produção paranaense é ligeiramente superior à nacional (1.418 L/vaca/ano), mas ainda considerada muito baixa, em função do grande número de animais ordenhados, estimado em 1.355.000 vacas. Salienta-se que existiam, em 1997, 44.272 produtores de leite no Estado (SEAB–DERAL, 1999).

A legislação de normas e padrões de qualidade vigente, totalmente ultrapassada, aliada a um sistema pouco eficiente de inspeção sanitária criou uma condição de mercado *sui generis*, com consumidores exigentes em preços baixos e, em sua maioria, incapazes de evidenciar um produto de má qualidade. Assim, as indústrias não restringem a aquisição de matéria-prima de baixíssima qualidade, que está geralmente associada às condições de produção descritas anteriormente (JANK et al., 1999)

O consumo médio per capita, em 1999, foi de 138 L/ano (JANK et al., 1999), abaixo da recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que é de 216 L/ano, do consumo verificado na Argentina (190 L/ano) e no Uruguai (238 L/ano), segundo a SEAB–DERAL (1999). Houve um crescimento do consumo per capita no País, desde o início do Plano Real, mas estabilizado a partir de 1997.

Deve-se frisar que atualmente ocorre um aumento de consumo do leite UHT e do leite informal.

Esta situação, entretanto, deverá mudar por esforços de produtores, indústrias, instituições governamentais e de pesquisa, que já estão trabalhando no Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL). O Ministério da Agricultura estuda a possibilidade de implantar a contagem de células somáticas (doravante denominada CCS) como parâmetro legal da qualidade do leite cru resfriado comercializado em todo o país, com o limite de 1.000.000 células/mL, a partir de 01 de janeiro de 2002, reduzindo-se para 750.000 em 01 de janeiro de 2005 e, então, para 400.000 células/mL, em 01 de janeiro de 2008. Os valores e as datas são diferenciados para regiões, tendo sido referidas acima as informações para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país (BRASIL, 1999).

Esta aplicação de novas normas, somada às condições do mercado implicará na necessidade de conhecimento da real situação do setor, ou seja, de coleta de informações sobre o sistema agroindustrial do leite (RIBAS, 1998).

O cenário que ora se desenha exigirá, entre outras mudanças, uma maior especialização do produtor e a adequação da cadeia produtiva do leite às normas propostas. A adoção da CCS para a avaliação da qualidade do leite reduzirá uma antiga defasagem em relação aos programas similares utilizados pelos Estados Unidos, União Européia, Austrália e Nova Zelândia, os principais grupos produtores de leite e que dominam o mercado internacional do produto.

Assim, faz-se necessário o conhecimento da atual situação da qualidade do leite, com disponibilidade de informações sobre a CCS em rebanhos com controle leiteiro oficial, que são a maior parte dos dados disponíveis sobre CCS. Ainda, o

conhecimento dos fatores que influenciam a CCS é fundamental para que estas possíveis alterações nos padrões de pagamento e inspeção do leite sejam eficazes no seu propósito.

A escolha do estudo dos efeitos de meio ambiente sobre a CCS no leite de vacas da raça Holandesa no Estado do Paraná baseia-se na inexistência de dados nacionais sobre tal parâmetro; na disponibilidade de resultados de produção e composição do leite nos arquivos do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR), da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) e no fornecimento de subsídios para outras pesquisas nesta área no País.

Os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Identificar e quantificar os efeitos de alguns fatores de ambiente sobre a CCS, estimando os componentes de variância para esta característica em amostras de leite de vacas da raça Holandesa no Estado do Paraná;
- b) Comparar as três expressões de contagem de células somáticas (escore de células somáticas (ECS), logaritmo de células somáticas (L2CS) e a CCS), como medidas da sanidade da glândula mamária.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CONTROLE LEITEIRO**

O controle leiteiro oficial de rebanhos é a mais importante prova zootécnica para bovinos leiteiros, com intensa difusão entre os produtores de países de pecuária desenvolvida, como Estados Unidos, Canadá, Alemanha, França, Inglaterra, Austrália e Nova Zelândia, servindo de base para as decisões que norteiam tal atividade econômica nestes países. No Brasil, esta prática é pouco difundida, pois somente 3% das vacas leiteiras são submetidas ao controle oficial (RIBAS, 1998).

O PARLPR, da APCBRH, acumulou uma vasta quantidade de informações a respeito da produção e análise da qualidade de amostras de leite (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e CCS) oriundas de vacas em controle leiteiro oficial no Estado e também de amostras de leite provenientes de tanques de leite de rebanhos filiados a indústrias e cooperativas agropecuárias.

Tais informações disponibilizam aos produtores de leite e instituições como associações de criadores, Ministério da Agricultura, indústrias de laticínios, universidades, institutos de pesquisa e centrais de teste de reprodutores, um banco de dados detalhado sobre o desempenho de vacas e rebanhos, de modo que decisões precisas podem ser tomadas visando o melhoramento genético e ambiental

de rebanhos, além da possibilidade de orientar medidas de normatização higiênico-sanitária da pecuária leiteira.

No Brasil, por delegação do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, cabe às associações nacionais de criadores a promoção desta importante prova zootécnica. No Paraná, por subdelegação, cabe à APCBRH a execução do controle leiteiro oficial (RIBAS, 1999a).

A APCBRH indica o Estado do Paraná ocupando os primeiros lugares no ranking nacional em número de lactações encerradas e número de criadores por estado, representando 37,29% e 33,65%, respectivamente, do total de rebanhos em controle leiteiro oficial do País (ABCBHRH, 1999).

A APCBRH foi fundada em 27 de março de 1953, com o objetivo de congregiar os criadores e de fomentar os serviços de Registro Genealógico e Controle Leiteiro. O Serviço de Controle Leiteiro (SCL) teve sua origem, na APCBRH, em 01 de julho de 1966, iniciando os trabalhos com 88 animais distribuídos em três rebanhos distintos (RIBAS et al., 1997).

Em 1983, firmou-se o convênio entre a APCBRH e o Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), visando estabelecer condições técnicas para informatizar o SCL, criar um banco de dados e desenvolver a tecnologia necessária na área de programas básicos de computação e de sistemas operacionais para o gerenciamento de arquivos de dados e a produção de relatórios sobre o desempenho dos animais e dos rebanhos inscritos no programa (RIBAS et al., 1997).

Em 1987 foi estabelecido o convênio de cooperação técnica entre a APCBRH, a UFPR e a McGill University, de Montreal, Canadá, com o apoio

financeiro da Agência Canadense de Desenvolvimento Internacional (CIDA). Este convênio objetivou a cooperação nas áreas de transferência de tecnologia, doação de analisadores eletrônicos de leite, treinamento técnico, desenvolvimento de *softwares* e banco de dados, inaugurando o Laboratório Centralizado do PARLPR em 20 de maio de 1991, para análise de leite e determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e quantidade de células somáticas (RIBAS et al., 1997).

Em 1990, o SCL sofreu alterações em seu organograma e passou a ser denominado Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR), que conta com a seguinte infra-estrutura: Secretaria, Setor de Operações de Campo, Laboratório Centralizado de Análise de Leite, Centro de Processamento de Dados e Desenvolvimento e Pesquisa (RIBAS et al., 1997).

Na segunda fase do convênio internacional, o projeto teve por objetivo implementar o serviço de análise de alimentos e de matérias-primas utilizados na pecuária leiteira, por método infravermelho a partir da doação pela McGill University de um analisador NIRs, com a implementação futura de relatórios para manejo nutricional dos rebanhos controlados (RIBAS et al., 1997).

## 2.2 MASTITE BOVINA

### 2.2.1 DEFINIÇÃO

Um dos problemas sanitários mais graves da pecuária leiteira baseada na criação de bovinos da raça Holandesa é a mastite. O termo mastite refere-se à inflamação da glândula mamária, em 90 a 95% dos casos causada por microrganismos, caracterizando-se por alterações físicas, químicas e, em geral, bacteriológicas do leite e por alterações patológicas do tecido glandular (BLOOD e RADOSTITS, 1991).

A mastite pode ser classificada em dois grandes grupos, de acordo com sua manifestação. A primeira forma é a mastite clínica, que se caracteriza pelos evidentes sinais de um processo inflamatório, como sensibilidade dolorosa à palpação da glândula mamária, aumento da temperatura do tecido mamário, hiperemia da pele do quarto acometido, edema local e perda de função, com menor quantidade secretada e alterações visíveis na composição e características físico-químicas do leite. O diagnóstico, portanto, pode ser realizado com a evidência dos sinais, por um exame clínico e por testes como o da caneca de fundo escuro ou telado no início da ordenha, que permitem visualizar as alterações do leite, como odor, coloração, consistência, presença de grumos ou flocos de pus e sangue (BLOOD e RADOSTITS, 1991).

O segundo grupo refere-se à mastite subclínica, que visualmente não se permite diagnosticá-la, porém havendo alterações significativas na composição e



características bioquímicas do leite. Uma das principais mudanças, neste caso, é o aumento da quantidade de células, principalmente leucócitos polimorfonucleares (PMN), excretadas no leite. A incidência de mastite subclínica representa 90 a 95% do total de casos da doença (BLOOD e RADOSTITIS, 1991).

Pode-se definir mastite como uma enfermidade caracterizada pelo influxo significativo de neutrófilos PMN do tecido mamário para o leite de glândulas acometidas (BLOOD e RADOSTITS, 1991; DELUYKER, 1991; HARMON, 1994).

A mastite pode ser classificada também de acordo com algumas características dos agentes causadores, em mastite contagiosa e mastite ambiental (BRAMLEY et al., 1996). A mastite contagiosa é causada mais freqüentemente por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária. Está associada a expressivas elevações da CCS, com baixa incidência de casos clínicos e muitos casos subclínicos, geralmente crônicos e de longa duração (raramente abaixo de trinta dias). O conhecimento destas informações é fundamental para a adoção de medidas de controle, já que estes agentes transmitem-se para animais sadios principalmente no momento da ordenha. Assim, embora difícil, estes casos são passíveis de erradicação do rebanho, principalmente o *S. agalactiae*.

A mastite ambiental é causada por bactérias que habitam, como o nome sugere, o ambiente da vaca, como o solo, piso, cama, esterco e barro. São descritos casos por *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp* coagulase-negativos, streptococci não-*agalactiae* (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*) e outras, geralmente enterobactérias. Os casos são predominantemente clínicos, agudos, de curta duração – até cerca de dez dias,

já que o úbere não é o habitat preferencial dos agentes – e concentram-se no periparto. Não estão associados a marcantes ou prolongadas elevações da CCS, portanto, não são geralmente diagnosticados pela CCS. Embora haja a possibilidade de transmissão durante a ordenha, principalmente se houver falhas no funcionamento do equipamento, o principal momento de transmissão é entre ordenhas. Sua erradicação é impossível, visto que os potenciais patógenos estão disseminados por todo o ambiente (BRAMLEY et al., 1996).

## 2.2.2 PERDAS ECONÔMICAS

A mastite é a principal doença de rebanhos leiteiros no mundo todo. Nos Estados Unidos, BRAMLEY et al. (1996) citaram um prejuízo na ordem de US\$ 2 bilhões ao ano em decorrência da moléstia. No Brasil, LARANJA DA FONSECA (1992) estimou uma incidência de 38% de casos de mastite. COSTA et al. (1999) relataram incidência de até 71% das vacas em rebanhos de Minas Gerais e São Paulo.

É sabido que as perdas são diretamente proporcionais à CCS e que são maiores quanto maior o número de lactações da vaca (Tabela 03). As perdas econômicas resultantes da incidência de mastite subclínica no rebanho trazem o agravante de não serem prontamente identificadas pelo produtor. Por outro lado, os custos de prevenção são facilmente associados a dispêndio de recursos.

É importante ressaltar que cerca de 70 a 82% da estimativa do prejuízo causado pela mastite devem ser atribuídos à forma subclínica e 18 a 30%, à forma

clínica (COSTA et al., 1999). O principal prejuízo é a perda de produção de leite (LARANJA DA FONSECA, 1992; BRAMLEY et al., 1996; COSTA et al., 1999).

Para a mastite, há forte retorno econômico do investimento na prevenção. COSTA et al. (1999), em trabalho com rebanhos leiteiros de São Paulo e Minas Gerais, estimaram que o custo médio com a prevenção de mastite foi de US\$ 28,93/vaca/ano e as perdas estimadas pela doença foram, em média, de US\$ 317,38/vaca/ano. O custo médio com prevenção estimado foi de US\$ 1.558,59/propriedade leiteira/ano e o prejuízo estimado, em média, foi de US\$ 20.611,32/propriedade leiteira/ano.

Conforme MUNRO et al. (1984), as alterações nos componentes do leite podem ser atribuídas a três eventos patológicos principais, como o aumento da permeabilidade vascular, devido ao processo inflamatório; lesão do epitélio secretor, comprometendo a síntese de alguns componentes; e ação de enzimas originadas de bactérias ou das próprias células somáticas.

Altas CCS não estão associadas a alterações significativas do teor de proteína do leite (AULDIST e HUBBLE, 1998). Entretanto, ocorre um aumento da concentração de proteínas séricas, como albuminas e imunoglobulinas, que apresentam baixo valor para a indústria de derivados lácteos. Concomitantemente, ocorre uma significativa redução na quantidade de caseínas, as frações de proteína mais interessantes do ponto de vista econômico. Esta redução resulta tanto da depressão da síntese (lesão do epitélio secretor), quanto por ação de proteases bacterianas e plasmáticas, que lisam a caseína em fragmentos menores. Havendo menor síntese como um todo, haverá menores produções absolutas de proteína

(BOOTH e HARDING, 1984; WALSTRA e JENNESS, 1984; HARMON, 1994; AULDIST et al., 1995).

Vacas com elevadas CCS mostram menores teores de gordura (AULDIST e HUBBLE, 1998; PEREIRA et al., 1999a), além de maiores proporções de ácidos graxos de cadeia curta, por ação de lipases leucocitária e do próprio epitélio secretor mamário. Esta lipólise dos glóbulos de gordura expõe os triglicerídeos à ação das próprias lipases, acarretando elevação de ácidos graxos livres e o aparecimento de rancidez no leite (BOOTH e HARDING, 1984).

A redução da quantidade de lactose presente no leite de vacas com mastite subclínica (HOLDAWAY et al., 1996a; PEREIRA et al., 1999a) dá-se, a exemplo do que ocorre com a proteína, por lesão do epitélio secretor, mas também pode ser devida ao resultado do processo inflamatório, com passagem de lactose do leite para o sangue (AULDIST e HUBBLE, 1998). Contribui, de qualquer maneira, para uma menor produção láctea, pelo seu papel de agente regulador osmótico do volume de leite.

A presença de mastite resulta, ainda, na alteração das proporções de minerais no leite. Há passagem de potássio do leite para o sangue e, inversamente, há importante trânsito de sódio e cloro para o interior da glândula mamária (FOX, 1985; AULDIST e HUBBLE, 1998). Fósforo e cálcio também estão reduzidos, pois o cálcio normalmente está presente nas micelas de caseínas, e a menor síntese destas reduz o teor do mineral. O pH tende a elevar-se, pela passagem de componentes alcalinos do sangue para o leite e, como comentado anteriormente, aumenta a presença de algumas enzimas, como proteases (plasmina, principalmente), lipases, n-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase), hialuronidases,

fosfatase ácida,  $\alpha$ 1–antitripsina, fosfatase alcalina, arilsulfatase,  $\beta$ –glucuronidase, catalase, transaminase glutâmica oxaloacética, lactato desidrogenase, lisozima, xantina oxidase e várias esterases.

Uma das razões da indústria de laticínios se motivar pelo pagamento do leite pela qualidade, inclusive por células somáticas, é a tentativa de manter o conceito de que os produtos lácteos são "puros e naturais" para consumidores cada vez mais exigentes. Entretanto, é fundamental a obtenção de matéria-prima de alta qualidade, cujo processamento e produtos finais podem ser severamente influenciados quando leite com altas CCS é utilizado.

Segundo HILL (1991), é pouco provável que as células somáticas por si só sejam responsáveis por todas estas alterações na qualidade de produtos industrializados. A inflamação, fenômeno do qual as células são um indicador, induz mudanças em uma grande variedade de componentes do leite, que são os prováveis responsáveis por todas estas mudanças observadas em leite com altas CCS, junto com a presença de bactérias no leite, em determinados casos. A facilidade da determinação do número de células a faz um excelente indicador.

Para o leite cru, a lipólise e a proteólise, que ocorrem com maior frequência no leite com altas CCS, contribuem para o sabor rancificado e a redução da lactose associada ao acréscimo de sódio e cloro determinam sabor salgado (MUNRO et al., 1984). Os resultados de MA et al. (2000) mostraram que o uso de leite com elevadas contagens celulares pode resultar em níveis superiores de ácidos graxos livres durante o armazenamento refrigerado do produto, acarretando redução do tempo de prateleira e sabor amargo e rancificado do produto, que é considerado o pior defeito de qualidade pelo consumidor. Estudos com leite UHT (tratamento em

temperatura ultra alta) mostraram maior propensão à geleificação, reduzindo o tempo de prateleira, um dos principais argumentos de venda deste produto. A plasmina, principal enzima responsável pela proteólise, pode continuar ativa após a pasteurização, indicando que mesmo após este processo, a proteólise continua (AULDIST et al., 1996a).

A redução da estabilidade térmica do leite tem importância na determinação da qualidade do leite evaporado, do leite em pó e do leite condensado. Esta variação parece estar relacionada aos maiores valores de pH e com a redução dos teores de cálcio e magnésio. O leite proveniente de glândula infectada foi menos resistente ao aquecimento a altas temperaturas que o leite normal, resultando em coagulação (MUNRO et al., 1984).

A presença de mastite determina uma perda quantitativa na produção de queijo. MUNRO et al. (1984) exemplificaram que em uma indústria recebendo 113.000 L de leite por dia, com 10% das vacas apresentando mastite subclínica, haveria uma perda de 132 kg de queijo por dia. Outros autores também relataram perdas no rendimento industrial e ressaltam a menor qualidade do queijo produzido (POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988; KLEI et al., 1998).

Os prejuízos na produção de queijo ocorrem pelos menores teores de gordura e proteína observados, pelo aumento das proteínas séricas e pela redução da caseína, conseqüente à ação da plasmina. A plasmina hidrolisa parte da  $\beta$ -caseína nas porções menores de  $\gamma$ -caseína e fragmentos de polipeptídeos, que mais tarde se difundem na fração protéica do soro do leite, determinando, com outros fatores, uma maior presença de proteína, gordura e lactose no soro. Reduzem-se, conseqüentemente, a coagulação e a firmeza da massa e a expulsão do soro,

resultando em queijos com maiores teores de umidade. Os tempos necessários para a coagulação também foram maiores e observou-se deterioração do sabor do queijo (MUNRO et al., 1984; BARBANO et al., 1991; HARDING, 1995; AULDIST et al., 1996b).

O resultado da lipólise, maior produção de ácidos graxos, é perceptível sensorialmente pelo sabor rancificado e pode ser detectado a partir de 400.000 células/mL. Observa-se um impacto maior em produtos com altos teores de gordura, como manteiga, creme, requeijão e alguns queijos e além da alteração no sabor, reduz-se o tempo de prateleira dos produtos. No creme, necessita-se de um tempo maior para se atingir o tamanho ideal dos glóbulos (MUNRO et al., 1984; HARDING, 1995).

Para os produtos elaborados com o uso de culturas lácteas, a proteólise em leite com altas CCS determinou menor firmeza, menor estabilidade térmica e a indesejável separação do soro no produto final já embalado (HARDING, 1995). O leite mastítico, tanto normal quanto reconstituído, foi de inferior qualidade para a quantidade e velocidade de produção de ácidos desejados, em consequência da presença de fatores de inibição, termolábeis ou termoestáveis, podendo ser antimicrobianos no leite ou substâncias naturais, como imunoglobulinas (MUNRO et al., 1984; SMITH e HOGAN, 1998).

### 2.2.3 DIAGNÓSTICO

A mastite subclínica, pelo que foi descrito, necessita de testes indiretos para o seu diagnóstico, os quais baseiam-se principalmente no aumento de células somáticas no leite. Os principais métodos disponíveis para uso rotineiro são o *California Mastitis Test* (CMT), o *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) e a CCS (PHILPOT e NICKERSON, 1992).

O CMT, bastante prático, de baixo custo e de simples execução, pode ser realizado no momento da ordenha, de cada quarto mamário individualmente, com uma bandeja apropriada. Seu reagente possui um detergente que rompe a membrana celular dos leucócitos, liberando o conteúdo nucléico, o qual apresenta maior viscosidade. Deste modo, o resultado é feito pela graduação da viscosidade, em cinco categorias: negativo, traços, +, ++ e ++++. Apresenta como desvantagens a possibilidade de erros nas dosagens de reagente e de leite, diminuindo sua acurácia, além da necessidade de padronização da leitura, que está sujeita a variações de acordo com a pessoa que realiza o teste. De qualquer modo, é um meio de diagnóstico de mastite subclínica no momento da ordenha e permite identificar rapidamente o quarto acometido (NMC, 1999).

O WMT é um aprimoramento do CMT (NMC, 1999), pois é conduzido em tubos apropriados, com um orifício em sua extremidade, e onde se colocam quantidades exatas de leite e do reagente (o mesmo do CMT, diluído em água destilada em 1 : 1). Os tubos precisam ser invertidos por exatos 15 segundos, e quanto maior o conteúdo celular, maior a viscosidade e maior o volume de mistura



que permanece no tubo. A coluna fluida no tubo é medida em milímetros (mm), resultando em um teste mais objetivo que o CMT. Geralmente é empregado em rebanhos maiores e, ainda, em algumas indústrias de laticínios. Utiliza-se amostra composta dos quatro quartos, já que este teste permite uma velocidade maior de execução. Na Tabela 02, vê-se a relação entre os três principais métodos de diagnóstico de mastite subclínica e estimativas de perda de produção de leite.

Existem outros meios de diagnóstico desta doença, ressaltando-se a condutividade elétrica, que pode ser realizada por equipamentos automatizados inseridos no próprio equipamento de ordenha. A avaliação diária de cada vaca permite corrigir diferenças individuais e disponibiliza este método como mais uma ferramenta para o acompanhamento da saúde da glândula mamária. Também a dosagem de alguns componentes ou mensuração de características químicas do leite pode ser utilizada como diagnóstico, tal como pH, atividade, NAGase, sódio, potássio, lactose e antitripsina. Entretanto, HOLDAWAY et al. (1996b) mostraram que a CCS apresentou especificidade ligeiramente inferior à dosagem de NAGase e de potássio, mas possui uma maior sensibilidade à identificação correta dos quartos ou vacas infectados, quando comparada com todos os métodos anteriores. Os mesmos autores relataram, também, que a sensibilidade da CCS mostrou pequenas variações entre rebanhos.

A cultura microbiológica é outra forma imprescindível de diagnóstico de mastite, principalmente ao possibilitar a identificação do agente, direcionando as medidas de controle (NMC, 1999).

#### 2.2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A CCS no leite é meio de diagnóstico de mastite subclínica, sendo técnica eficaz, muito estudada e aceita internacionalmente como uma mensuração padrão da qualidade do leite cru (RIBAS, 1998), além de ser referência para a prevalência de mastite em rebanhos e um indicador das condições gerais da higiene na produção de leite (SMITH, 1996; HARMON, 1998a). Também têm sido muito estudados os parâmetros genéticos da CCS ou do ECS, para sua inclusão nos programas de melhoramento genético de bovinos leiteiros.

Por estas razões, a CCS tem sido disponibilizada em países em desenvolvimento. Porém, só em 1991 foi introduzida no Brasil pela APCBRH / PARLPR, por meio do convênio de cooperação internacional com a UFPR e a McGill University (RIBAS, 1998).

A CCS varia grandemente entre rebanhos, vacas e entre controles distintos em uma mesma vaca, devido a fatores genéticos e ambientais, sendo estes de suma importância na interpretação dos resultados. A herdabilidade relatada para a característica é baixa, entre 0,06 e 0,14 (MONARDES e HAYES, 1985), indicando que um estudo de efeitos de ambiente sobre a CCS é fundamental e mesmo em estudos genéticos torna-se primário identificar e quantificar tais influências ambientais, de modo que efeitos genéticos possam ser obtidos sem tendências, identificados e quantificados (MONARDES, 1984; RIBAS, 1996).

As contagens múltiplas são uma realidade para os produtores de leite pela disponibilidade de equipamentos eletrônicos de contagem celular, que são de valor considerável na determinação da presença de inflamação (RIBAS, 1999b).

As contagens diferenciais não merecem maior atenção pela dificuldade de identificação dos tipos celulares e pelo fato da contagem total refletir adequadamente o grau de envolvimento da glândula pelo processo inflamatório (EMANUELSON e WEVER, 1989; BLOOD e RADOSTITS, 1991).

Os equipamentos são muito acurados na contagem total de células, com coeficiente de variação (CV) inferior ( $P < 0,01$ ) à contagem manual (MILLER, et al., 1993). Porém, a importância da contagem depende da proporção leucócitos e células epiteliais, as quais representam de 0 a 7% do total, no leite sadio e até entre 11 a 16% em leite com mastite (MILLER et al., 1991). Segundo HARMON e RENEAU (1993), na glândula sadia o predomínio de leucócitos é de macrófagos. Estes mesmos autores e MONARDES (1984) citaram que quando instalado um processo inflamatório, os neutrófilos PMN podem passar a compor cerca de 90% das células do leite. Cerca de cinco diferentes tipos celulares podem ser encontrados no leite mastítico: PMN intactos e degenerados, linfócitos, monócitos, macrófagos e células epiteliais.

Experimentalmente, existem resultados (O'SULLIVAN et al., 1992) com o uso de um anticorpo monoclonal específico para PMN e posterior realização de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*).

## 2.3 EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A *International Dairy Federation* (IDF) publicou uma extensa revisão sobre fatores ambientais que influenciam a ocorrência de mastite bovina (IDF, 1987). Afirmou-se que a mastite é uma doença multifatorial, que envolve três biosistemas: a vaca, o patógeno e o ambiente. Portanto, a ocorrência da doença é determinada pela perda de equilíbrio entre estes três componentes. Afirmou-se que a mastite é um fenômeno de adaptação, pois dificilmente um fator isoladamente poderia ser considerado o mais importante na patogênese da moléstia, além do efeito da combinação de vários efeitos ser decisivo na incidência da doença.

### 2.3.1 INFECÇÃO

A presença de infecção na glândula mamária é o principal fator de variação na contagem de células em amostras de leite do quarto mamário, da vaca ou do rebanho (DOHOO e MEEK, 1982; IDF, 1996b; HARMON, 1998a), contrastando com a IDF (1987). Porém, no leite de vacas sadias, a CCS geralmente é menor que 200.000 células/mL (e até menor que 100.000 células/mL em animais de primeiro parto). JONES et al. (1984) relataram que, a partir de 100.000 células/mL, há menor produção de leite e maiores taxas de infecção. De modo genérico, o valor de 200.000 células/mL é aceito como indicativo da presença de infecção, embora BARKEMA et al. (1997) utilizaram, em um estudo com 150

rebanhos na Holanda, o valor de 250.000 células/mL, mesmo valor sugerido pela IDF (1996b) como divisor do leite originário de glândulas inflamadas daquele proveniente de glândulas sadias. No Brasil, THIERS et al. (1999) observaram aumento significativo da CCS na presença de infecção intramamária.

Os agentes causadores da mastite podem ser divididos em patógenos maiores e menores. Os patógenos maiores (principalmente *S. aureus* e *S. agalactiae*) causam grande aumento na CCS (HOLMES et al., 1996), ao oposto dos patógenos menores (*Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* sp coagulase negativos) (HARMON e RENEAU, 1993). Em uma mesma lactação, SHELDRAKE et al. (1983) encontraram, em quartos livres de infecção aos 75 e aos 285 dias de lactação, CCS variando entre 80.000 a 160.000 células/mL; nos quartos infectados por *S. aureus*, no mesmo intervalo, 234.000 e 1.000.000 células/mL. JONES et al. (1984) encontraram somente 6% das amostras abaixo de 100.000 células/mL com presença de patógenos maiores ou menores.

Não se deve afirmar que determinado valor representa uma classificação segura da presença ou não de infecção na glândula mamária. Porém, uma elevação além de 200.000 a 250.000 células/mL está associada a uma anormalidade na composição do leite e maior frequência de processo inflamatório intramamário. Segundo HARMON (1998a), somente o uso da CCS para classificar uma amostra de leite como proveniente de quarto mamário infectado está sujeito a erros, tanto por falsos positivos quanto por falsos negativos.

A CCS da vaca depende diretamente da CCS de cada quarto individualmente e do volume de leite produzido. A CCS dobra a cada nova infecção de um quarto. Utilizando-se a CCS composta, consegue-se um índice de

classificação correta como infectado ou não infectado de 77,9 a 92,7% conforme o número de quartos com infecção aumenta de um para quatro (PHILPOT e NICKERSON, 1992).

HARMON e RENEAU (1993) relataram uma correlação de 0,86 entre amostras individuais de cada quarto e a composta, podendo ambas serem utilizadas para o diagnóstico da mastite subclínica. Observou-se menor frequência de infecções intramamárias nos quartos mamários anteriores do que nos quartos posteriores (BARKEMA et al., 1997). Deve-se considerar, sempre, o fator diluição do leite de quartos com alta CCS no de outros com muito baixa CCS, quando da análise de amostra composta da vaca (DOHOO e MEEK, 1982).

### 2.3.2 FREQUÊNCIA DE ORDENHA

STELWAGEN e LACY-HULBERT (1996), observaram um aumento da CCS no leite quando comparadas vacas ordenhadas duas vezes com outras, uma única vez ao dia. Entretanto, não houve variações nos aspectos microbiológicos do leite e sugerem que o efeito seja, provavelmente, devido a um enfraquecimento das junções celulares das células mamárias epiteliais, facilitando o influxo de células somáticas no leite. HOLMES et al. (1996) observaram maior queda de produção de leite, com a redução de duas para uma ordenha diária, em vacas com elevadas CCS (690.000 células/mL), quando comparadas com vacas com baixa CCS (80.000 células/mL). Houve, ainda, elevação da CCS com a redução do número de ordenhas, mais acentuada nas vacas com altas CCS.

KLEI et al. (1997) relataram médias semelhantes de CCS para grupos de animais com duas ordenhas diárias e para outro grupo ordenhado três vezes ao dia, observando apenas uma tendência de redução da CCS com o aumento do número de ordenhas, comparando-se vacas dentro do mesmo estágio de lactação. Creditou-se esta diminuição na CCS ao maior volume de produção de leite e ao aumento da taxa de eliminação de alguns casos de mastite com o aumento da frequência, afinal, a remoção mais freqüente do leite reduz as possibilidades de colonização bacteriana no epitélio secretor mamário.

MOORE et al. (1983), estudando relações entre duas medidas de tempo de ordenha e CCS e ECS (transformação em logaritmo natural), observaram que as correlações fenotípicas entre CCS e as medidas de tempo de ordenha foram significativas, mas pequenas. Tal resultado, segundo aqueles autores, foi concordante com as informações disponíveis na literatura, que relatam pequena ou nenhuma correlação entre parâmetros de velocidade de ordenha e de mastite.

### 2.3.3 IDADE DA VACA AO PARTO

A literatura cita aumento da CCS com o avançar da idade, mas pela maior incidência de infecção em vacas mais velhas do que efeito da própria idade em si, pois trabalhos com vacas sadias mostraram pouco ou nenhum efeito com a idade. Vacas mais velhas apresentaram maior resposta celular a ambos os tipos de mastite, devido ao maior número de quartos infectados, maior extensão do tecido lesado e maior resposta celular em um tecido previamente infectado. O coeficiente de correlação entre CCS e idade foi quase linear, e foi atribuído 10% da variação do

log da CCS à idade (DOHOO e MEEK, 1982; KENNEDY et al., 1982; SHELDRAKE et al., 1983; HARMON e RENEAU, 1993). De um modo geral, o efeito da idade dentro da mesma ordem de parição pareceu ser desprezível, mas foi significativo entre diferentes ordens de parto.

A intensidade do aumento da CCS durante a lactação em vacas sem confirmação de cultura bacteriológica negativa foi proporcional à idade ao parto. A hipótese de infecções justificou-se em estudos com vacas sadias, onde não houve aumento significativo, principalmente para animais de primeiro parto (DOHOO e MEEK, 1982; KENNEDY et al., 1982; SHELDRAKE, 1983; MILLER et al., 1991; HARMON e RENEAU, 1993). MONARDES (1984) observou que, na primeira lactação, as mais altas CCS foram encontradas no início da lactação, e que nas demais, ao final.

JAARTSVELD et al. (1983) observaram que a idade da vaca ao parto teve efeito maior que o estágio de lactação sobre a CCS. A cada parto, MONARDES (1984) observou uma taxa de aumento de 80.000 células/mL, até a quarta lactação e relatou que o efeito da idade dentro da mesma ordem de parição tendeu a diminuir em importância até a quarta lactação.

DELUYKER et al. (1993) não encontraram significância no efeito de ordem de parição ( $P > 0,05$ ). HOLDAWAY et al. (1996a), na Nova Zelândia, observaram que o efeito da idade da vaca ao parto foi importante fonte de variação da CCS entre rebanhos.



### 2.3.4 ESTAÇÃO DE PARTO

Esta variável tem, geralmente, pequeno efeito sobre a CCS, exceto em vacas mais velhas. MONARDES (1984) encontrou diferença significativa, exceto para animais de primeira lactação e, inverso ao esperado, as maiores CCS foram no início do inverno. SCHUKKEN et al. (1990), na Holanda, encontraram as maiores CCS em outubro (outono) e as menores, em abril (primavera, naquele país). Relataram que a elevação da CCS acontece quando as vacas são soltas para pastoreio (maio) e o decréscimo das contagens é observado no início da estação de confinamento do gado. Estes resultados sugerem que há interferência das condições de pastoreio, temperatura e de umidade, segundo aqueles autores. Todavia, comentam que este comportamento pode ser confundido com o efeito de estágio de lactação, já que a maioria das parições ocorre em abril e assim, houve menor média dos dias em lactação neste mês.

Outros autores observaram CCS menores no inverno e mais altas no verão, persistindo mesmo após o início do declínio da temperatura e umidade ambientais. Este relato coincide com a maior incidência de mastite clínica no verão, principalmente a de origem ambiental, já que há maior quantidade de coliformes no solo, cama e estábulos (DOHOO e MEEK, 1982; HARMON e RENEAU, 1993). OTT et al. (1999), analisando médias geométricas de CCS de tanque, originárias de 43% dos produtores e 35% da produção dos Estados Unidos, encontraram maiores valores no verão (pico em agosto, com 336.700 células/mL) e os menores, no inverno (mais baixo em novembro, com 257.000 células/mL), mesma tendência

observada por MILLER et al. (1999), também naquele país, trabalhando com dados provenientes de lactações encerradas.

Estes últimos resultados sugerem que a temperatura por si não é a causa da elevação da CCS, o que ocorre como resultado de uma maior exposição da região do esfíncter do teto aos patógenos e, conseqüentemente, maior incidência de casos clínicos durante os meses de verão (HARMON, 1998b). LARANJA DA FONSECA et al. (1998) observaram significância da temperatura ambiental mínima sobre a mastite subclínica (CMT). Quando as temperaturas foram altas durante o dia e amenas durante a noite, os animais conseguiram dissipar calor e evitar maiores danos decorrentes do estresse térmico. Quando a temperatura mínima não foi baixa o suficiente, os animais ficaram submetidos a temperaturas acima de sua zona de conforto durante grande parte do dia; conseqüentemente, tais vacas tiveram maior dificuldade para aliviar os danos do estresse térmico. Deste modo, pode-se esperar queda de produção em animais sob estresse térmico.

#### 2.3.5 ANO DE CONTROLE

O efeito do ano de controle provavelmente se deve à resposta ao melhoramento genético para a produção de leite e às melhoras das condições de manejo dos animais. MONARDES (1984) observou uma tendência de queda da CCS com o passar dos anos, mais acentuada em vacas jovens do que nas mais velhas. Justificou como conseqüência do aprimoramento do manejo sanitário.

SCHUKKEN et al. (1990), trabalhando com CCS de tanque de leite de aproximadamente 27.000 rebanhos na Holanda, observaram uma redução da CCS

no período estudado. Em 1982, a mediana da CCS foi de 375.000 células/mL e, em 1987, 300.000 células/mL; houve grande decréscimo em 1984 e 1985, coincidindo com a implantação de cotas de produção de leite na Comunidade Européia.

Na província de Ontário, no Canadá, GODKIN (1999) relatou a redução da média da CCS de leite de tanque na província, de 400.000 em 1986, para cerca de 250.000 células/mL, em 1998. Grande parte desta redução se deveu à adoção do programa de controle de mastite denominado de "Plano de cinco pontos do NMC" e à implantação do limite oficial de 500.000 células/mL. Sobre o fato da referida média permanecer relativamente estável nos últimos quatro anos, a autora sugere duas possíveis justificativas: muitos produtores permaneceram abaixo do limite legal, mas não continuaram a buscar a redução desta contagem ou a estabilidade ocorre em consequência da própria estabilização do limite.

### 2.3.6 ESTÁGIO DE LACTAÇÃO

O estágio de lactação influenciou significativamente a CCS (DELUYKER et al., 1993; HOLDAWAY et al., 1996a), que apresentou-se alta imediatamente após o parto, até cinco a quatorze dias, decorrente de aumento da descamação de células epiteliais no colostro, independente da presença de infecção. Notou-se um declínio por volta dos 25 a 45 dias de lactação (coincidente ao pico da curva de lactação) e aumento gradativo, durante todo o restante da lactação, fundamentalmente como resultado de infecções clínicas e subclínicas durante a lactação e, com menor importância, como consequência de mudanças endócrinas relacionadas com o final da gestação ou, ainda, por efeito da concentração das

células somáticas no leite. Assim, a maior influência do período de lactação sobre a CCS decorreu da presença de infecção intramamária (HARMON, 1998a).

HARMON (1998b) descreveu um aumento da CCS ao final da lactação somente quando a produção diária decresceu abaixo de 4,0 kg/vaca, embora não tenha sido conduzida a cultura bacteriológica do leite, neste experimento. Sugere-se que este aumento seja conseqüente ao efeito de diluição das células somáticas no leite.

A inclusão da correção da CCS para a produção de leite no dia da coleta da amostra reduziu a significância do efeito do estágio de lactação, com a CCS corrigida iniciando a lactação em altos níveis; a seguir, decresceu de maneira acentuada até aos 30 dias, manteve-se até aos 180 dias e, então, decresceu lentamente até a secagem (JAARTSVELD et al., 1983; MONARDES, 1984).

Em vacas com mastite clínica, a queda da CCS no início da lactação não ocorreu ou foi menos pronunciada (DELUYKER et al., 1993).

### 2.3.7 IDADE DA AMOSTRA

No trabalho de KENNEDY et al. (1982), o tempo de conservação da amostra, entre a coleta e a análise, com o uso do dicromato de potássio e manutenção em temperatura ambiente, teve efeito significativo e quanto mais prolongado, menor a CCS. Nos três primeiros dias, permaneceu praticamente inalterada, mas no oitavo dia atingiu um declínio de 28 a 36%, se comparada a uma amostra de um dia.

LEE et al. (s.d.) encontraram significância nos efeitos de idade da amostra, temperatura de armazenamento e conservante sobre o ECS. O maior valor do ECS foi observado no dia um, o que era esperado, uma vez que as amostras devem ser mantidas por 24 horas para a análise pelo equipamento Fossomatic. A partir do segundo dia, o ECS declinou gradualmente. Neste estudo, os autores observaram que houve redução do ECS ( $P > 0,05$ ), mas houve efeito expressivo do superaquecimento ( $34^{\circ}\text{C}$  por 4 horas), com o ECS reduzindo de  $2,76 \pm 0,03$  para  $2,54 \pm 0,02$ . Portanto, recomendaram muita atenção com o superaquecimento, que teve maior probabilidade de acontecer próximo à coleta e no momento do transporte.

O resultado acima contrasta com os de MONARDES et al. (1996), no Canadá, que não observaram significância do efeito de idade da amostra sobre a CCS, em experimento onde compararam três opções de conservantes (bronopol líquido de largo espectro, com inibidor de crescimento fúngico; bronopol microtab e dicromato de potássio), sob quatro diferentes sistemas de armazenamento das amostras (sem refrigeração, com refrigeração no laboratório até a análise, com refrigeração no transporte até a análise e com refrigeração completa, desde a coleta até a análise). Todavia, houve decréscimo da CCS em amostras de leite mantidas sem refrigeração e os autores observaram uma tendência da CCS elevar-se até o sétimo dia, quando mantidas sob refrigeração. Recomendaram, ao final, que amostras que serão analisadas em alguns dias após a coleta devam ser mantidas sob refrigeração, nas condições do referido estudo (temperaturas médias máximas de  $24$  a  $34^{\circ}\text{C}$ ) e que a refrigeração das amostras no laboratório também proporcionou uma maior segurança para o resultado da análise.

SETHAR et al. (1979) encontraram resultados semelhantes, mas ao analisarem vários efeitos ambientais e genéticos sobre a CCS, por ordem de lactação, observaram que amostras de leite de vacas com dois anos de idade mostraram uma queda, ao final do período de análise (oito dias), apenas ligeiramente inferior à CCS observada aos três dias. Já para as vacas adultas, com mais de seis anos de idade, esta queda foi mais acentuada.

O NMC, dos Estados Unidos, recomendou o uso de amostras de leite fresco ou refrigeradas para a CCS, se em poucos dias após sua coleta. Amostras previamente congeladas não podem ser utilizadas (NMC, 1999).

#### 2.3.8 EFEITO DE VACA

Diferenças entre vacas foram mais importantes que as que ocorreram devido ao rebanho. A variância devida a vaca foi de 23,8 a 34,7% do total e reflete a importância dos efeitos genéticos mais efeitos permanentes de ambiente próprios da vaca, como por exemplo, elevadas CCS decorrentes de infecção crônica durante a lactação estariam sendo expressos dentro do efeito de vaca (KENNEDY et al., 1982).

Estes mesmos autores relataram que 52,7 a 66,6% da variância na CCS no dia do teste foram atribuídos ao resíduo para aquele controle leiteiro da vaca. Este resíduo diminui com o avanço da idade. HARMON (1998b), afirmou que as diferenças entre vacas foram importante fonte de variação na CCS. SETHAR et al. (1979) observaram que os componentes de vacas contribuíram com 23,8 a 34,7%

da variação entre observações do ECS (logaritmo natural), de acordo com a idade da vaca.

MILLER et al. (1993), comparando contagens manual e eletrônica (citometria de fluxo) de células somáticas no leite de vacas sem mastite, observaram significância ( $P < 0,01$ ) na variação entre vacas, principalmente para as contagens eletrônicas.

### 2.3.9 REGIÃO GEOGRÁFICA

ALLORE et al. (1997), trabalhando com dados do nordeste dos Estados Unidos, encontraram significância estatística do efeito de subregião nas variáveis produção de leite e CCS de tanque. Ressaltaram que as regiões com maiores CCS, e ainda com menores teores de proteína e gordura no leite, devem ser consideradas quando do uso deste leite para a industrialização e que a melhora nestes índices significaria, também, um aumento de produção.

OTT et al. (1999) observaram menores CCS para o estado de Novo México, que apresenta um clima extremamente seco, seguido pelos estados do chamado "Cinturão do leite" e pelos estados das Planícies do Norte. Os estados do sul daquele País, com seu clima mais quente e úmido, mostraram as maiores médias regionais no ano de 1997. As diferenças anuais entre as CCS de tanque entre tais regiões foram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

MILLER et al. (1999), analisando o ECS de mais de 3.300.000 de lactações nos Estados Unidos, observaram as menores médias para as regiões

Nordeste e Noroeste daquele país e as maiores, concordando com os resultados de OTT et al. (1999), no sul.

#### 2.3.10 REBANHO

Envolve essencialmente fatores ambientais, como decisões de manejo, alimentação, ordenha, instalação, clima e sanidade. KENNEDY et al. (1982) sugerem que esta variação entre rebanhos possa conter um pequeno componente genético, devido a diferenças nos critérios de seleção de vacas, quer sejam para mastite, CCS ou características associadas. Estes autores encontraram 9,6 a 13,2% da variação total no log natural da CCS devida ao efeito de rebanho. Além destes pesquisadores, MONARDES (1984) relata que as diferenças entre vacas individualmente são mais importantes do que a análise dos rebanhos propriamente. JAARTSVELD et al. (1983) observaram que 12% da variação total foram devidos ao efeito de rebanho. SCHUKKEN et al., (1990) mostraram que rebanhos com CCS média do tanque entre 150.000 e 300.000 células/mL têm maior probabilidade de permanecerem nesta faixa de contagem, quando comparados a rebanhos com CCS maiores.

VALDE et al. (1997) não observaram diferença significativa entre as médias de CCS de rebanhos com instalações do tipo *free stall*, quando comparadas às de rebanhos em estábulos do tipo *tie stall*. Todavia, encontraram maiores médias do log de CCS para os maiores rebanhos, em relação aos pequenos rebanhos, contrariando os resultados de OTT et al. (1999), nos Estados Unidos, que observaram um decréscimo na CCS do tanque quanto maior o rebanho analisado.



Estes autores obtiveram uma média de 339.000 células/mL, para o grupo com menos de 36 vacas e produção aproximada de 22.000 L leite/mês. Já para a classe de 142 a 355 vacas e com 90.000 a 226.000 L leite/mês, a média observada foi de aproximadamente 305.000 células/mL.

EMANUELSON e FUNKE (1991), analisando a CCS do tanque de 15.514 rebanhos leiteiros na Suécia, observaram que a média geométrica foi de 204.000 células/mL e que houve aumento da incidência de mastite com o aumento da produção total de leite no rebanho.

#### 2.3.11 GRAU DE SANGUE

DOHOO e MEEK (1982) não recomendaram a inclusão do efeito de raça nos estudos sobre CCS, discordando de JAARTSVELD et al. (1983) que observaram diferença significativa entre duas raças avaliadas em seu estudo. ALMEIDA (1996), trabalhando com dados de produção de leite e gordura em vacas da raça Holandesa no Paraná, encontrou significância entre os diferentes graus de sangue.

#### 2.3.12 FATORES NUTRICIONAIS E MASTITE

Para se otimizar a relação entre nutrição e resistência mamária a infecções, as dietas devem estar corretamente formuladas e preparadas para as respectivas categorias, sejam novilhas, vacas em lactação em seus diversos estágios ou vacas secas. Além disto, interações entre os nutrientes também podem

contribuir para a ocorrência de deficiências nutricionais, podendo interferir com a ocorrência de mastite.

Segundo ERSKINE (1993), os antioxidantes têm sido apontados como um ponto fundamental na eficiência da fagocitose intramamária como mecanismo de destruição de bactérias e parecem ser a ligação entre nutrição e resistência à mastite. A destruição de bactérias por reações oxidativo-dependentes nos leucócitos intramamários normalmente está restrita ao fagolisossoma, pois caso estes processos bioquímicos atingissem o citoplasma, a célula do hospedeiro poderia ter suas membranas, alguns processos enzimáticos e ácidos nucleicos danificados. Em resposta a este possível risco é que uma gama de defesas antioxidantes derivadas de micronutrientes protegem a célula do hospedeiro.

Os requerimentos de vitamina A podem também ser expressos na forma de pró-vitamina A ou  $\beta$ -caroteno, pois esta é a forma mais freqüentemente encontrada desta vitamina nos alimentos, segundo o *National Research Council* (NRC, 1989). A vitamina A atua na prevenção da peroxidação de lipídeos de membrana. Houve resposta favorável da destruição de bactérias *in vitro* em neutrófilos de vacas deficientes em  $\beta$ -caroteno e vitamina A, quando o  $\beta$ -caroteno foi adicionado ao meio de cultivo celular (ERSKINE, 1993).

Este autor relata que as concentrações séricas médias de vitamina A e  $\beta$ -caroteno não diferiram entre rebanhos com alta ou baixa CCS. Quando analisadas vacas individualmente, a CCS foi reduzida durante a lactação em vacas suplementadas com vitamina A e  $\beta$ -caroteno 30 dias pré-parto. A administração de 170.000 UI de vitamina A/dia não resultou em redução da freqüência de casos de mastite clínica ou novas infecções intramamárias durante o período seco, ao parto

ou nas primeira seis semanas de lactação, comparados com vacas suplementadas com 50.000 UI de vitamina A/dia. O nível recomendado pelo NRC é de 3.200 UI/kg de matéria seca (MS) da ração, para vacas leiteiras em lactação (NRC, 1989).

As funções da vitamina E estão intimamente relacionadas com a ação do selênio, atuando como um antioxidante biológico, ao transformar radicais livres em metabólitos de oxigênio não reativos. A forma mais ativa para bovinos é o  $\alpha$ -tocoferol (NRC, 1989). A suplementação de vitamina E para vacas leiteiras aumentou a capacidade de destruição de bactérias fagocitadas e diminuiu a produção de peróxidos extracelulares, quando comparadas com neutrófilos de vacas deficientes em selênio. A fagocitose em si não é alterada (ERSKINE, 1993). O NRC (1989) recomendou o uso de 15 UI de vitamina E/kg MS da dieta de vacas leiteiras em lactação.

O selênio é um componente da enzima glutathion-peroxidase (GSH-Px), que apresenta atividade antioxidante, ao reduzir os peróxidos a água e álcoois pelo uso de um tripeptídeo, glutathion, como um doador de elétrons. Contribui, desta maneira, para a proteção de membranas lipídicas (ERSKINE, 1993). Embora seja conhecido também por sua toxicidade, a deficiência é mais freqüente. Cálcio, arsênico, cobalto e enxofre podem reduzir a absorção de selênio em mais de 50%.

ERSKINE (1993) relatou que vacas suplementadas durante o período seco com vitamina E, além da injeção de selênio antes do parto, mostraram incidência 37% menor de mastite clínica, além da duração ser 62% menor nestes casos, comparadas com controles não suplementados. Valores iguais a 57 e 40%, respectivamente para os dois parâmetros anteriores, foram observados em outro experimento com animais primíparas, com efeitos durante os oito primeiros meses

de lactação. Sabe-se que os níveis sanguíneos de selênio e GSH-Px são superiores em vacas com menores CCS do que naquelas com elevadas contagens. Ainda, a prevalência de infecção e a CCS do tanque foram correlacionadas negativamente com a atividade da GSH-Px, com a concentração plasmática de selênio e com os níveis de vitamina E na dieta. Altos níveis sanguíneos de selênio e vitamina E foram associados com menores taxas de mastite clínica e com menores CCS do tanque.

Segundo ERSKINE (1993), o pico da concentração de bactérias no leite (*E. coli*, neste experimento) e a duração da infecção foram maiores em animais com dieta deficiente em selênio quando comparados com outros, com níveis adequados do mineral. Assim, pela maior quantidade de bactérias, o grupo selênio-deficiente apresentou maior gravidade do quadro clínico, com maior queda da produção leiteira. Entretanto, a suplementação com selênio não mostrou diferença significativa para casos de mastite causados por *S. aureus*. Assim, supõe-se que o selênio pode ser favorável em casos de infecção aguda, mas não necessariamente em casos de mastite crônica. O nível recomendado pelo NRC é de 0,3 ppm de selênio/kg MS da dieta, para vacas em lactação (NRC, 1989).

A menor suplementação de selênio, vitaminas A e E para vacas secas pode resultar em menor atividade da GSH-Px no início da lactação, significando menor poder de antioxidação justamente no momento em que ocorrem a maioria das infecções clínicas da glândula mamária – próximo ao parto. Todavia, não há indícios de qualquer vantagem no uso de níveis acima dos preconizados pelo NRC para a melhora da resistência do tecido mamário às infecções (ERSKINE, 1993).

O zinco é um componente essencial de inúmeros sistemas enzimáticos, que incluem metabolismo energético, de carboidratos e de ácidos nucleicos; síntese

protéica; integridade de tecidos epiteliais; divisão e reparação celular; absorção, transporte e utilização de vitaminas A e E. Por atuar na divisão celular e síntese protéica, o zinco contribui para a integridade do tecido secretor mamário. Além disto, é componente essencial da enzima superóxido-dismutase (SOD), que tem propriedades antioxidantes, contribuindo para a proteção de membranas lipídicas. (HARMON e TORRE, 1994).

A deficiência deste mineral diminui a resposta imune celular, ao diminuir a atividade de linfócitos T; promove atrofia do baço e do timo e, ainda, reduz a atividade da resposta humoral. Um outro possível mecanismo de ação do zinco na redução da CCS pode estar relacionado ao seu papel na incorporação da cistina à queratina. O botão de queratina do esfíncter do teto serve tanto como barreira física quanto química contra a invasão de patógenos (SORDILLO et al., 1997). Recomenda-se o uso de 40 ppm de zinco/kg MS na dieta de vacas leiteiras em lactação (NRC, 1989).

HARMON (1999) relatou que as funções do cobre incluem sua participação em diversas proteínas, como a ceruloplasmina e a SOD. Sua deficiência pode influenciar a magnitude da lesão tecidual que ocorre durante um processo inflamatório. Além da deficiência absoluta do cobre na dieta, em ruminantes pode haver deficiência relativa, por excesso de enxofre, molibdênio, zinco ou ferro. O NRC preconiza o uso de 10 ppm de cobre/kg MS na dieta de vacas em lactação (NRC, 1989).

Ainda, segundo este autor, a ceruloplasmina é a principal proteína que se liga ao cobre, respondendo por aproximadamente 90% do volume circulante do mineral. Animais com mastite clínica apresentam níveis superiores da proteína,

comparados com animais sadios. Acredita-se que ela atue como antioxidante, removendo radicais livres e possa servir como um modulador endógeno da resposta inflamatória, além de servir como proteína transportadora de cobre. Deste modo, a ceruloplasmina contribui para reduzir os danos ao tecido secretor mamário em caso de inflamação aguda. Portanto, a redução dos níveis sanguíneos da proteína poderia comprometer os mecanismos de defesa da glândula mamária.

A SOD está presente em vários tecidos e catalisa a dismutação de radicais superóxido tóxicos para peróxido de hidrogênio e oxigênio. Esta reação é muito importante na proteção de membranas contra a oxidação por radicais livres de macrófagos e neutrófilos durante a resposta inflamatória. Os níveis da enzima reduzem-se na deficiência alimentar de cobre. O mecanismo de fagocitose e destruição de microrganismos é uma função da resposta imune celular inespecífica de neutrófilos e macrófagos e constitui-se em importante meio de proteção da glândula mamária bovina contra bactérias patogênicas. Assim, animais hipocuprêmicos mostram menor atividade de fagocitose de granulócitos, menor atividade da SOD no sangue, em neutrófilos e eritrócitos e menores quantidades teciduais do mineral (HARMON, 1999).

Novilhas da raça Holandesa deficientes em cobre, comparadas ao grupo controle, mostraram menores níveis hepáticos do mineral (não houve diferença entre os níveis sanguíneos), taxas mais elevadas de infecção nos quartos mamários no momento do parto, maiores CCS e maior severidade dos quadros de mastite clínica. Entretanto, não se observou diferença estatisticamente significativa na produção de leite ou em outros parâmetros da inflamação mamária quando da infecção por *S. aureus*. O uso de proteinato de cobre resultou em maior quantidade de cobre

depositado no fígado, principalmente nos períodos próximos ao parto. Ainda, sugeriu-se que esta forma orgânica de suplementação de cobre tenha aumentado sua biodisponibilidade, comparada à forma de sulfato de cobre, em novilhas periparturientes. O nível plasmático de cobre respondeu à suplementação com proteinato de cobre, mas os teores de ceruloplasmina mostraram-se mais elevados em relação ao grupo controle (dieta basal de cobre) somente com o uso de sulfato de cobre. Assim, talvez a forma orgânica do cobre seja absorvida e ou transportada de modo diferente da inorgânica (HARMON, 1999).

O manganês também atua na SOD (ERSKINE, 1993), mas segundo o NRC (1989), a deficiência deste mineral não é freqüente, pois encontra-se em níveis relativamente altos nas forragens.

O ferro catalisa a produção de radicais oxigênio, como o radical hidroxila, a partir de substratos superóxidos e peróxidos acumulados. Durante a fase aguda de um caso de mastite, ocorre uma depressão dos níveis plasmáticos de zinco e ferro. O seqüestro de ferro pode aumentar os níveis de proteínas ligadas a este elemento, como a lactoferrina, que acredita-se ser inibidora do crescimento de bactérias gram-negativas. Além disto, o ferro é catalisador da peroxidação lipídica e da formação de radicais livres. Portanto, o seqüestro do ferro em casos agudos de mastite por gram-negativos caracteriza-se em mecanismo de antioxidação, ao reduzir a taxa de formação de radicais livres resultante da ativação do fagócito.

Embora haja perspectivas de otimização da resistência do tecido mamário à infecção bacteriana por fatores nutricionais, é fundamental que seja executado um manejo de ordenha que obedeça às recomendações básicas do controle de mastite.

### 2.3.13 OUTROS EFEITOS

Agentes causadores de estresse nos animais, tais como animais dominantes no grupo, mistura de grupos de animais, ocorrência de estro ou estresse calórico têm uma importância contestada pela literatura, mas geralmente pouco ou nenhum efeito na CCS. Deve-se ressaltar, ainda, que este parâmetro deve ser sempre analisado em conjunto com outras informações do rebanho (DOHOO e MEEK, 1982; IDF, 1990; HARMON, 1998a). Vacinação contra febre aftosa, independente do estado prévio da glândula mamária, não teve nenhum efeito sobre a CCS (IDF, 1990).

COULON et al. (1998) compararam dois grupos de vacas, o primeiro mantido em um estábulo e o outro, tendo que caminhar aproximadamente 9,0 km após a ordenha da manhã, por 23 dias. Observaram que o leite das vacas não infectadas mostrou um aumento na CCS de 47.000 células/mL, em relação às vacas mantidas no confinamento, ao passo que as vacas com mastite subclínica, tiveram um aumento de 185.000 células/mL sobre as vacas que não precisaram deslocar-se. Os autores concluíram que o efeito da presença de infecção e processos inflamatórios traumáticos decorrentes do exercício extremo mostraram efeito de importância econômica sobre a CCS.

HOLMES et al. (1999) submeteram vacas a restrição alimentar, que culminou com uma queda de 30% na produção de leite e observaram que as vacas que tinham CCS baixa (80.000 células/mL) no início do experimento apresentaram uma pequena redução na contagem ao final do teste. Já as vacas que tinham



elevadas CCS no leite (690.000 células/mL) antes da restrição mostraram elevação na CCS.

RODRIGUES et al. (1998) observaram efeito significativo ( $P < 0,01$ ) da CCS sobre a resposta ao tratamento de vacas com a somatotropina bovina recombinante (rBST), determinando uma redução na produção diária individual de 0,515 L de leite corrigido para 3,5% gordura para cada unidade de aumento no log de células somáticas. Mostraram, deste modo, uma correlação negativa entre o ECS antes do tratamento e a aplicação de rBST.

Assim, parece que os diferentes fatores que possam causar algum tipo de estresse nos animais agravam a inflamação presente na glândula mamária. Entretanto, não se comprovou, até o presente momento, serem importantes fonte de variação da CCS em animais sadios (HARMON, 1998b).

Existe uma variação diária da CCS, resultado de fatores fisiológicos de cada quarto, mesmo em vacas sadias. A grande variação entre CCS de amostras tomadas em um curto intervalo de tempo em animais clinicamente sadios pode ser devida a infecção por patógenos já eliminados antes do seu isolamento ou por trauma (DOHOO e MEEK, 1982). MILLER et al. (1993) observaram uma significativa ( $P < 0,01$ ) variação diária da CCS de mesmas vacas (animais sadios), quando analisadas por citometria de fluxo.

De um modo geral, a CCS foi maior nos três primeiros jatos de leite e imediatamente após a ordenha, persistindo alta por quatro horas, decresceu de modo gradativo até imediatamente antes da ordenha seguinte, no seu ponto mais baixo. A ordenha da tarde apresentou CCS 20% maior que a da manhã (DOHOO e MEEK, 1982; HARMON e RENEAU, 1993). No Brasil, PEREIRA et al. (1999b)

relataram diferença significativa ( $P < 0,01$ ), entre as CCS tomadas na ordenha da manhã (261.000 células/mL) e da tarde (369.000 células/mL), recomendando, portanto, que as amostras de leite para análise da CCS devam ser coletadas em amostras compostas das duas ou três ordenhas, quando for o caso. HARMON (1998a) relatou que tanto amostras dos quartos mamários quanto amostras compostas podem ser utilizadas para a CCS.

Programas de controle da mastite no rebanho podem conter medidas que resultam numa redução expressiva da CCS. Como, por exemplo, o Plano de cinco pontos do NMC, citado por GODKIN (1999), que inclui a imersão dos tetos em desinfetante após a ordenha, uso de toalhas de papel individual para limpar e secar os tetos antes da ordenha, tratamento com antimicrobiano de todos os quartos de todas as vacas no momento da secagem, além do tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite e descarte de vacas com mastite crônica.

Esta mesma autora citou que os programas de pagamento de leite por qualidade, no mundo todo, têm sido um meio eficaz de reduzir a prevalência de infecções intramamárias crônicas nos rebanhos, declinando, conseqüentemente, os valores de CCS.

No Brasil, METTIFOGO et al. (1999), demonstraram que medidas de controle de mastite, como as descritas acima, além da redução da utilização de água no preparo dos animais para a ordenha, revisão e manutenção de ordenhadeiras, ordenhar por último os animais com mastite crônica e práticas gerais de limpeza e higiene do local de permanência dos animais reduziram substancialmente a CCS média (sem discriminar o método do cálculo desta média) dos animais de 863.000 para 215.000 células/mL, após um ano de esforços. Além disto, vacinas contra

coliformes têm mostrado resultados eficazes; também já havendo alguns tipos de vacinas contra *S. aureus* (ALBERTON, 1999).

VALDE et al. (1997) observaram que rebanhos cuja limpeza das vacas era classificada como “muito boa” tiveram médias de CCS significativamente menores que os rebanhos cujas vacas receberam “boa” e “intermediária”.

Houve uma expressiva elevação da CCS no início de um evento de mastite clínica, ou seja, na fase aguda. Seguiu-se, então uma redução discreta, conforme as bactérias vão sendo fagocitadas pelos PMN e, posteriormente, uma redução mais lenta nas contagens. A intensidade e a duração de cada fase dependeu de características individuais dos animais e da patogenicidade do agente. Tanto em infecções crônicas quanto em animais sadios a CCS mostra flutuações, ressaltando-se que nesta última situação as contagens encontraram-se geralmente abaixo de 200.000 células/mL (HARMON, 1998a).

KENNEDY et al. (1982) relataram que, embora alguns fatores que influenciam a CCS pudessem ser identificados e quantificados, muito da causa desta variação permanecia desconhecida. JAARTSVELD et al. (1983) afirmaram que o melhor conhecimento dos fatores mensuráveis que interferem com a CCS será de grande utilidade para a maior eficácia do uso da CCS como método diagnóstico de mastite e, segundo MONARDES (1984), importante para a estimativa apropriada dos efeitos genéticos livres de influências ambientais.

## 2.4 TRANSFORMAÇÃO LOGARÍTMICA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

SHOOK (1982) desenvolveu o ECS, uma transformação logarítmica que pode ser obtida pela seguinte equação:

$$\text{ECS} = \log_2 (\text{CCS}/100.000) + 3$$

Desta forma, é possível classificar o ECS. Na Tabela 04, observa-se o ECS e sua relação com a CCS. Este cálculo pode ser obtido também com logaritmo natural ( $\log_e$ ) de células somáticas. Em função de uma escala logarítmica ser um múltiplo constante de qualquer outra escala logarítmica, a escolha da base é aleatória e as propriedades estatísticas são as mesmas.

A opção pelo uso do logaritmo de base 2 pode ser justificada por ele produzir uma amplitude de aproximadamente 10 pontos e porque cada ponto de acréscimo (ou decréscimo) no ECS está associado com a duplicação (ou a divisão ao meio) da CCS. SHOOK e RUEGG (1999) comentaram que o log de base 2 é amplamente utilizado nos programas de controle de rebanhos leiteiros ao redor do mundo.

Para se calcular a CCS a partir do ECS, pode ser utilizada a equação:

$$\text{CCS} = 100.000 \times 2^{(\text{ECS} - 3)}$$

Como citado anteriormente, os estudos sobre bancos de dados de células somáticas visam, entre outros objetivos, realizar avaliações genéticas e fornecer informações para os programas de controles de mastite. Assim, é fundamental que esta análise seja suficientemente precisa e confiável.

O uso do ECS, em relação à CCS apresenta cinco vantagens principais, descritas a seguir (ALI e SHOOK, 1980; SHOOK, 1982; HUNT e ANDERTON, 1993; SHOOK e RUEGG, 1999):

- a) A herdabilidade para o ECS é de aproximadamente 0,12 e, para a CCS, 0,06. Uma maior porção das diferenças entre animais é devida à hereditariedade e uma menor fração a fatores de influências ambientais não explicadas.
- b) Os resultados dos testes de hipóteses são mais precisos para o ECS do que os de CCS. Os valores de F na análise de variância para o ECS são aproximadamente o dobro daqueles para a CCS. Isto significa que uma menor quantidade de informações é necessária para obtenção de um resultado confiável ou que uma segurança maior é obtida quando se dispõe do mesmo número de observações. Também, os erros-padrão e os intervalos de confiança são relativamente menores para o ECS do que para a CCS. Todas estas vantagens são fundamentais, pois o ECS traduz de maneira mais segura a realidade de uma população de vacas ou de um conjunto de amostras de tanque. Fornece-se, deste modo, maior precisão para as tomadas de decisão de manejo e para as análises estatísticas.
- c) A relação entre ECS e produção de leite é linear, enquanto a relação com a CCS é não linear. Esta relação mede o impacto da mastite na produção de

leite. A vantagem de uma relação linear é que cada unidade que varia o ECS está associada a uma mudança constante na produção em qualquer nível do ECS. Para a CCS, um aumento de 100 células/ $\mu$ L está associado a um decréscimo na variação da produção conforme a CCS aumenta. Deseja-se que a relação entre duas variáveis seja linear. Portanto, o ECS cria uma impressão mais acurada sobre o impacto da mastite na qualidade do leite.

- d) A distribuição da frequência da CCS é fortemente aleatória, com a média substancialmente superior à mediana. Ambas, CCS de tanque e de vacas, não apresentam distribuição normal, mas a perda de normalidade é maior para as observações de animais individualmente. O ECS segue uma distribuição normal. Ainda, a distribuição normal é desejada em análises estatísticas e em certos aspectos de avaliações genéticas, especialmente a estimativa dos componentes de variância.
- e) A média do ECS é próxima à mediana, ou seja, cerca de 50% dos valores estão posicionados de cada lado da média. Isto simplifica a interpretação das médias. Para a CCS, a média é consideravelmente maior que a mediana e esta diferença é bastante variável. A média da CCS é fortemente influenciada por uma pequena percentagem de valores extremos. A mediana da CCS é uma medida mais adequada do valor central em relação à média, mas a média é de mais fácil cálculo. O ECS elimina estas desvantagens, principalmente quando são analisados dados de vacas individualmente. Há uma menor vantagem do ECS quando comparam-se informações de CCS de tanque.

- f) A variância do ECS entre filhas do mesmo touro ou entre vacas dentro de rebanho é razoavelmente constante para cada touro ou para cada rebanho. Para a CCS, as variâncias são bastante oscilantes entre cada grupo. Manter a variância constante dentro de todos os subgrupos é uma grande vantagem, permitindo o uso de um único valor para a variância que pode ser estimado de maneira confiável, utilizando-se todos os dados. Ainda, quando a variância é constante, a média junto com a variância comum caracterizam as observações em cada grupo. Muitos dos testes de hipótese usuais requerem variância constante, assim o ECS ajusta-se melhor aos testes de hipótese. Dados com heterogeneidade de variância requerem a estimativa de ambas, da média e da variância, para caracterizar cada grupo. Estimativas precisas da variância requerem um grande número de observações.

SHOOK e RUEGG (1999), comparando médias aritméticas de CCS e médias geométricas de ECS, observaram que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para este último parâmetro foi 6,5% superior ao  $R^2$  obtido para a CCS. Isto significa que a variação associada aos efeitos estudados (mês e rebanho) foi comparativamente maior e que a variação não explicada (erro) foi comparativamente menor para o ECS do que para a CCS. Observou-se, ainda, que os valores de F foram cerca de 30% maiores para o ECS, indicando uma maior segurança na análise. Esta maior precisão do ECS pode permitir a obtenção de significância de efeitos em um estudo com um número menor de observações, o que poderia não ser atingido com uso da média aritmética da CCS. Embora estas conclusões tenham sido obtidas em um estudo com CCS do tanque, sua aplicação estende-se ao

estudo de CCS de vacas individualmente, inclusive com uma maior diferença entre os valores de F, neste caso, o que dá maiores vantagens ainda para o uso do ECS.

Concluindo-se, as propriedades estatísticas do ECS são bastante superiores às das da CCS. Qualquer análise estatística baseada no ECS é mais significativa do que aquela baseada na CCS, se o propósito for caracterizar a performance do rebanho, o diagnóstico da mastite ou a estimativa do mérito genético dos animais.

Para a análise de uma série de observações de CCS, sejam de uma vaca durante a lactação, vacas dentro de um rebanho, ou referentes a vários rebanhos, recomenda-se o uso da média geométrica destas observações. SHOOK e RUEGG (1999) definiram média geométrica como enésima raiz do produto de  $n$  observações. Por exemplo, a média geométrica de 10, 100 e 1.000 é a raiz cúbica de  $10 \times 100 \times 1.000$ , ou seja, 100. Para que se possa comparar, a média aritmética destes valores é igual a 370. Assim, a média geométrica nunca é maior que a média aritmética e quanto mais díspar a distribuição das observações de CCS, maior a distância entre estes dois cálculos de médias.

Segundo SMITH (1997), a IDF recomenda que os dados de CCS do tanque, de vaca ou de quartos mamários, provenientes de determinado rebanho, região ou país, devem ser expressos como média geométrica verdadeira, ou seja, uma média geométrica de todas as médias geométricas dos rebanhos. Recomenda-se, ainda, que os dados sejam apresentados com os intervalos de confiança, percentis ou com variações dentro de valores fixos. A média ponderada pela produção de leite no dia do controle também pode ser utilizada. O uso da média geométrica para todos os cálculos evita que efeitos de tamanhos de rebanhos



tenham impacto na CCS do tanque, principalmente em pequenos rebanhos onde uma vaca com elevada CCS pode interferir significativamente com a CCS do tanque.

No Brasil, o Ministério da Agricultura está submetendo à consulta pública um regulamento técnico que determina a implantação legal da CCS para produtores individualmente (ou seja, CCS do tanque), com o uso de média geométrica sobre um período de quatro meses, com pelo menos duas análises por mês (BRASIL, 1999).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MEDIDAS DESCRITIVAS**

Os dados utilizados neste estudo foram provenientes dos arquivos do PARLPR, responsável pelo serviço de controle leiteiro no Paraná, desenvolvido em convênio entre a APCBRH e a UFPR. A sede do PARLPR localiza-se em Curitiba, Paraná.

As observações de CCS no leite são oriundas de lactações encerradas de vacas da raça Holandesa, de rebanhos oficialmente controlados pelo PARLPR, no Estado do Paraná, coletadas de janeiro de 1993 a agosto de 1999.

As coletas das amostras de leite foram realizadas durante os controles leiteiros oficiais da APCBRH, por um técnico por ela designado, sendo tomadas duas amostras de cada vaca individualmente, nas ordenhas da tarde e da manhã e, em caso de três ordenhas, também na terceira. Esta amostra individual foi chamada observação do teste mensal ou amostra do dia do teste ou amostra do dia do controle. O leite foi conservado pela ação do dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), mantido à temperatura ambiente e enviado para o Laboratório Centralizado do PARLPR, local de análise. A partir de 1999, iniciou-se o uso do conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol).

As amostras de leite foram analisadas para percentagens de gordura e proteína, no equipamento automatizado Bentley 2000<sup>®1</sup>, e para contagem de células somáticas totais, por citometria de fluxo, no equipamento modelo Somacount 500<sup>®1</sup>.

A contagem eletrônica de células somáticas ocorre quando o equipamento cora o DNA das células somáticas com brometo de etídio e as expõe à luz ultravioleta, fazendo com que o complexo DNA-corante emita luz fluorescente, medida como impulso elétrico. Uma pequena corrente do fluido conduz as células coradas fluorescentes através do fluxo, onde cada célula que passa através do feixe de luz produz uma curta refração, que atravessa uma série de filtros ópticos e lentes, sendo focada em um comprimento de luz apropriado. Os pulsos de luz são convertidos em pulsos elétricos, amplificados, eletronicamente filtrados e ordenados por tamanho para que se especifiquem as células somáticas. O computador conta os pulsos elétricos, indicando a contagem de leucócitos.

As características das regiões de onde se originaram as informações utilizadas neste trabalho estão nas Tabelas 05 (altitude e clima), 06 (temperatura) e 07 (precipitações pluviométricas). Tais características representam médias de observações coletadas entre 1988 e 1998, originárias de estações climáticas do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), para as seguintes regiões: **Arapoti** (estação de Telêmaco Borba); **Batavo**, no município de Carambeí; **Castrolanda**, no município de Castro; **Witmarsum**, no município de Palmeira (para as três, foram utilizados dados da estação de Ponta Grossa); **Clac** (estação de Pinhais); região **Norte** (estação de Londrina) e região **Oeste e Sudoeste** (estação de Cascavel) (IAPAR, 1999).

---

<sup>1</sup> Bentley Instruments, Inc. (P.O. box 150, Chaska, MN 55318, Estados Unidos).

Segundo a classificação de Köppen (IAPAR, 1999), os climas encontrados no Estado podem ser definidos por:

- a) Cfa: clima subtropical, temperatura média no mês mais frio inferior a 18° C e temperatura média no mês mais quente superior a 22° C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência a concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida;
- b) Cfb: clima temperado propriamente dito, com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18° C, verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22° C e sem estação seca definida.

Nas regiões citadas acima, a atividade leiteira apresenta suas peculiaridades, mas de modo genérico, pode-se dizer que os rebanhos das bacias de Arapoti, Batavo, Castrolanda, Witmarsum e Clac têm a atividade leiteira como a principal da propriedade, com animais de bom padrão zootécnico. Tais propriedades possuem boa infra-estrutura de alimentação, seja volumosa, na forma de pastagens, silagens, silagens pré-secadas de gramíneas de inverno e fenação, seja em termos de concentrado.

Nas regiões Norte, Oeste e Sudoeste, os rebanhos especializados encontram-se em menor proporção. A alimentação volumosa é baseada principalmente em gramíneas tropicais e os rebanhos apresentam menor infra-estrutura de alimentação e manejo e produtividade média inferior à das bacias leiteiras do sul do Estado.

Em todas as regiões, o manejo sanitário é executado com o controle da febre aftosa, brucelose, tuberculose, clostridioses e outras doenças respiratórias e

reprodutivas. Os rebanhos em controle leiteiro, em sua maioria, estão associados a tradicionais cooperativas de produção de leite e têm assistência técnica rotineira.

A ordenha é, em sua totalidade, realizada com ordenhadeiras mecânicas, de balde ao pé, leite canalizado e muitas propriedades dispõem de sala de ordenha. A mão-de-obra utilizada para tanto é familiar nos pequenos rebanhos e mista ou contratada, nos demais. O manejo de ordenha empregado, na maioria dos rebanhos, não atende às recomendações técnicas básicas de controle de mastite, que são:

- a) linha de ordenha: ordenhar primeiro os animais de primeiro parto ou animais sem histórico de mastite;
- b) desinfecção (*pré-dipping*) e secagem dos tetos antes da ordenha;
- c) tratamento imediato de todos os casos de mastite clínica;
- d) tratamento de todas as vacas com antimicrobianos no momento da secagem;
- e) descarte de animais com mastite crônica;
- f) higiene e conforto na área de permanência dos animais; e
- g) corretos instalação, funcionamento e manutenção do equipamento de ordenha.

A desinfecção dos tetos após a ordenha (*pós-dipping*) é utilizada com relativa frequência.

Para o estudo, portanto, não houve diferenciação, no momento da coleta da amostra, do estado sanitário da glândula mamária, nem coleta para cultura bacteriológica do leite.

### 3.2 PREPARAÇÃO DOS DADOS

As informações compreendidas ao intervalo de tempo desejado foram editadas do banco de dados original e armazenadas em um arquivo computacional, onde cada linha representou um controle mensal de cada vaca e as colunas continham três grupos de informações:

- a) identificação do animal: com os dados de rebanho, região, número de identificação no PARLPR, raça, origem da vaca, grau de sangue, identificação do pai no PARLPR, origem do pai e idade da vaca em meses;
- b) dados da lactação encerrada, contendo: frequência de ordenha, ordem de lactação, data do parto (dia, mês e ano), produção de leite total na lactação encerrada, data de secagem (dia, mês e ano) e total de dias da lactação encerrada;
- c) dados do respectivo controle: seqüência de controle, data do controle (dia, mês e ano), produção de leite no controle, CCS, percentagem de gordura, percentagem de proteína, dias em lactação (dias entre o parto e aquele controle) e dias entre coleta e análise da amostra (também chamado de idade da amostra).

As informações foram checadas quanto à consistência (falhas no arquivo, controles em duplicata e controles fora do período estabelecido). Assim, os dados foram preparados para serem analisados pelo programa computacional estatístico SAS.

Utilizaram-se 993.839 controles mensais de 52.432 vacas da raça Holandesa, de 588 rebanhos do Estado do Paraná, controlados entre janeiro de 1993 e agosto de 1999.

Visando melhor acurácia das análises, as restrições abaixo foram impostas ao arquivo, resultando na utilização de 640.937 observações mensais de 40.333 vacas, oriundas de 378 rebanhos. Assim, foram eliminados 352.902 controles mensais (Tabela 08). Tais restrições e as respectivas percentagens de observações eliminadas, considerando-se para este cálculo a aplicação de cada restrição individualmente sobre o arquivo completo, foram:

- a) rebanhos com menos de 100 controles no período total do estudo: foram eliminados 1,50% das observações;
- b) dados originários de outros estados ou com erros de identificação de região: 4,73%;
- c) raça diferente da Holandesa: 7,31%;
- d) sem anotação de grau de sangue ou com erros de identificação: 5,88%;
- e) idade ao parto inferior a 20 e superior a 144 meses: 0,53%;
- f) sem registro do número de ordenhas: 0,008%;
- g) produção de leite na lactação com erros (inferior ou igual a zero) e superior a 27.000 kg/vaca: 0,009%;
- h) duração da lactação inferior a 60 e superior a 600 dias: 1,03%. Houve maior tolerância com este limite superior dado que este número é proveniente de uma comunicação de secagem da vaca efetuada pelo criador. Assim, optou-se por valorizar a informação de dias em lactação, descrita adiante;

- i) controles mensais realizados nos anos de 1993 (por ser início das atividades e haver dados incompletos) e 1999 (pela análise de lactações encerradas e, evidentemente, haver informações também incompletas): 12,82%;
- j) observações originadas nos meses de janeiro de 1995 e fevereiro de 1997 (problemas com equipamento e rotinas do laboratório): 1,53%;
- k) produção diária de leite inferior a 4,0 e superior a 60,0 kg/vaca: 0,23%;
- l) CCS igual a zero: 13,12%;
- m) percentagens de gordura abaixo de 0,5% e acima de 7,0%: 1,28%;
- n) percentagens de proteína abaixo de 1,0% e acima de 5,0%: 2,43%;
- o) dias em lactação inferior a 4 e superior a 450 dias: 0,05%;
- p) idade da amostra com erros (menor que zero) e superior a 15 dias: 5,59%.

As percentagens de dados eliminados referem-se a cada restrição aplicada individualmente, todavia existem sobreposições entre as restrições. Por exemplo, eliminam-se os dados de um rebanho com menos de cem controles, mas este rebanho tem algumas observações com menos de quatro kg de leite/vaca/dia.

### 3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

A obtenção do arquivo de análise, a triagem prévia dos dados e a análise dos efeitos de meio ambiente foram realizadas no Centro de Processamento de Dados do PARLPR, da APCBRH, com sede em Curitiba, Paraná.

Para a análise dos efeitos de meio ambiente sobre a CCS foi utilizado o pacote estatístico SAS, versão 6.12 (SAS<sup>®</sup> System for Linear Models, 1991). O programa SAS utiliza basicamente um modelo de efeitos fixos. Mesmo quando



alguns efeitos sejam especificados como aleatório (opção "random"), os quadrados médios são estimados sob uma análise de efeitos fixos e os componentes de variância estimados são basicamente similares ao Método III de Henderson (ALMEIDA, 1996).

A grande limitação deste método para a estimativa dos componentes de variância é que os valores estimados podem não ser consistentes, especialmente quando houver mais de um efeito aleatório incluído no modelo. Outra limitação é que não é possível a inclusão das relações de parentesco entre os animais, fato rotineiro em melhoramento animal. E, por último, o SAS requer grande quantidade de espaço no disco rígido e grande capacidade de memória, para determinar quais efeitos são estimáveis. Mas, para análise dos efeitos de meio ambiente é um bom programa estatístico (ALMEIDA, 1996).

O SAS dispõe de inúmeros procedimentos, para vastas funções e que podem ser utilizados por áreas completamente distintas. Para o atual estudo foram utilizados os seguintes procedimentos:

- a) PROC MEANS, para estimativa das médias reais, desvios-padrão (DP), número de observações, valores mínimos e valores máximos;
- b) PROC FREQ, para a obtenção de tabelas de frequência de cada efeito estudado; e
- c) PROC GLM, através do Método dos Quadrados Mínimos, para a obtenção dos níveis de cada classe, para a análise de variância com os respectivos níveis de significância, para a estimativa das médias ajustadas com os respectivos erros-padrão e para a obtenção das soluções das classes de cada efeito do modelo (comando "solution").

Com a utilização da opção "solution", do PROC GLM, o SAS disponibiliza a estimativa dos desvios médios em relação à média da última classe, em cada efeito, ou seja, a última classe é zero e as demais são desvios dela. O cálculo da estimativa da média ajustada de cada classe foi feito do seguinte modo:

- a) Obteve-se a média do efeito: média aritmética simples dos desvios de cada classe;
- b) Obteve-se o valor  $\chi$ : média geral da variável (do GLM) menos a média do efeito;
- c) Estimou-se a média ajustada de cada classe: o valor  $\chi$  menos o desvio da classe.

Assim, os resultados foram apresentados na forma dos desvios médios de cada classe ou na forma das estimativas das médias ajustadas de cada classe.

Para a análise do efeitos de ambiente sobre a CCS foi utilizado o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklmnop} = \mu + F_i + I_j + E_k + M_l + D_m + A_n + V_{op} + e_{ijklmnop}$$

onde:

$Y_{ijklmnop}$ : observação referente à CCS ou ECS ou L2CS, da ordem de lactação  $p$ , da vaca  $o$ , com intervalo entre coleta e processamento da amostra  $n$ , com dias em lactação  $m$ , do ano e mês de controle  $l$ , da estação de parto  $k$ , da idade ao parto  $j$ , com frequência de ordenha  $i$ .

$\mu$ : média geral;

$F_i$ : efeito da frequência de ordenha  $i$ , com 2 classes, sendo  $i = 2$  ou 3 ordenhas;

- $I_j$ : efeito da associação idade da vaca (de 20 a 144 meses) \* ordem de lactação (esta com 5 classes: primeira, segunda, terceira, quarta e uma classe de quinta a décima lactações)  $j$ , sendo  $j = 1, 2, \dots, 528$ ;
- $E_k$ : efeito da estação de parto  $k$ , com 4 classes, respectivamente do primeiro ao último dia de cada mês, sendo  $k =$  verão (dezembro, janeiro e fevereiro), outono (março, abril e maio), inverno (junho, julho e agosto), primavera (setembro, outubro e novembro);
- $M_l$ : efeito de mês e ano de controle  $l$  (de janeiro de 1994 a dezembro de 1998), sendo  $l = 1, 2, \dots, 58$ ;
- $D_m$ : efeito de dias em lactação até determinado controle  $m$ , com 21 classes assim distribuídas: 18 classes de 15 dias (de 0 a 270 dias de lactação), 2 classes de 30 dias (de 271 a 330 dias) e uma classe de 120 dias (de 331 a 450 dias de lactação);
- $A_n$ : idade da amostra de leite  $n$ , sendo  $n = 15$  classes de um dia;
- $V_{op}$ : efeito vaca (aqui chamado de único)  $o$ , aninhado com os efeitos de região geográfica, rebanho, grau de sangue e ordem de lactação  $p$ ; obtida da seguinte forma: único = (((rebanho\*1.000.000) + identificação da vaca no PARLPR)\*10) + ordem de lactação
- $e_{ijklmnop}$ : erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ijklmnop}$ .

As variáveis dependentes avaliadas foram:

- a) Contagem de células somáticas (CCS): é a leitura do equipamento de contagem eletrônica de células somáticas, em 1.000 células/mL;

- b) Escore de células somáticas (ECS): é a transformação logarítmica da CCS (ALI e SHOOK, 1980 e SHOOK, 1982), obtida pela equação:  $ECS = \log_2 (CCS/100) + 3$ ;

Os valores de ECS correspondentes ao intervalo de CCS de zero a 12.000 células/mL foram forçados a serem iguais a zero, para se evitarem números negativos.

- c) Transformação logarítmica de células somáticas (L2CS): é o logaritmo de base 2 da CCS, obtido pela equação:  $L2CS = \log_2(CCS)$ .

O objetivo do uso da variável L2CS foi obter uma referência dos resultados do ECS, pois apresentam comportamento semelhante, apenas com menor CV. Não visou, portanto, dispor de uma mensuração que possa ser utilizada por profissionais de campo, já que o ECS tem esta função.

Neste estudo, cada lactação foi considerada um conjunto de dados. Ou seja, assumiu-se que cada lactação é uma vaca diferente e independente das demais, conforme comentado anteriormente. É evidente que esta conduta implica em um erro, já que pode existir mais de uma lactação de um mesmo animal e, assim, efeitos que possam estar incluídos em vaca repercutirão em todas as lactações, como as características genéticas, determinadas práticas de manejo e eventos individuais (perda de um quarto mamário, por exemplo). Entretanto, caso não tivessem sido incluídos os efeitos de rebanho e ordem de lactação no efeito de vaca, todos os controles poderiam ter sido considerados como de uma única lactação. Assim o procedimento adotado supera, ainda que parcialmente, o erro descrito anteriormente.

É importante ressaltar que o efeito de vaca, da forma como foi calculado (o efeito "único"), absorve os efeitos de região, rebanho, grau de sangue e frequência de ordenha. Isto por que a análise considera que cada classe (isto é, cada vaca) é originária de somente uma região, de um rebanho e tendo somente um grau de sangue. Deste modo, o modelo com "único" absorvido lista as soluções destes efeitos como iguais a zero.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MEDIDAS DESCRITIVAS

Na Tabela 09 estão relacionados valores médios, genéricos, de CCS encontrados na literatura, em diversos países.

**TABELA 09 – VALORES MÉDIOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) EM DIFERENTES PAÍSES, POR DIVERSOS AUTORES**

País	Médias CCS <sup>1</sup> (x 1.000 células/mL)
Israel	448
Itália <sup>2</sup>	426
Estados Unidos <sup>1, 5</sup>	353
Canadá (Quebec) <sup>3</sup>	293
Holanda <sup>2</sup>	280
Dinamarca	273
Reino Unido	273
Bélgica	258
Canadá <sup>2, 3</sup>	252
Suécia	231
Alemanha	230
Nova Zelândia <sup>4</sup>	177
Áustria	160
Finlândia	138

BOOTH (1996)

<sup>1</sup> Média geométrica

<sup>2</sup> Média aritmética (média geométrica pode ser 10 a 20% menor)

<sup>3</sup> LESLIE et al. (1996)

<sup>4</sup> MOHR (1998)

<sup>5</sup> OTT et al. (1999)

Estes resultados podem ser comparados aos valores médios obtidos no presente trabalho e descritos na Tabela 10. As médias e os respectivos desvios-padrão obtidos para CCS, para o ECS e para o logaritmo de células somáticas foram, respectivamente,  $556.626 \pm 835.004$  células/mL,  $4,461 \pm 1,789$  e  $8,105 \pm 1,789$ .

**TABELA 10 – MÉDIAS REAIS E DESVIOS-PADRÃO (DP) DE MEDIDAS DESCRITIVAS, DE 640.937 CONTROLES MENSAIS DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ**

Características	Média		DP
Idade da vaca (meses)	52,56	±	25,23
Produção de leite na lactação (kg/vaca)	8.370,9	±	2.645,0
Duração da lactação (dias)	339,49	±	77,62
Produção de leite no controle (kg/vaca/dia)	25,1	±	8,2
CCS (células/mL)	556.626	±	835.004
Escore de células somáticas (ECS)	4,461	±	1,789
Logaritmo de células somáticas (L2CS)	8,105	±	1,789
Percentagem de gordura	3,416	±	0,664
Percentagem de proteína	3,136	±	0,334
Dias em lactação médio	167,25	±	98,36
Idade da amostra (dias)	5,049	±	2,287

As médias de CCS observadas foram superiores àquelas descritas por ALLORE et al. (1997) e OTT et al. (1999), que analisaram CCS de tanque de propriedades leiteiras nos Estados Unidos e encontraram médias variando entre 257.000 em novembro a 336.000 células/mL em agosto. MILLER et al. (1999), também naquele país, analisando dados de mais de 3.300.000 lactações remetidos

aos programas de avaliação genética nos anos de 1996 e 1997, obtiveram médias estaduais variando entre 254.000 e 485.000 células/mL.

Tais médias são superiores até mesmo às obtidas por SETHAR et al., em 1979, no Canadá (441.200 células/mL). GODKIN (1999) relatou que aproximadamente 80% dos rebanhos da província de Ontário, naquele mesmo país, possuíam CCS do tanque abaixo de 300.000 células/mL, no mês de junho de 1999.

Os valores encontrados no Estado do Paraná demonstram que a incidência de mastite subclínica é alta nestes rebanhos, o que é grave, já que é bem descrita pela literatura a queda de produção de leite associada com altas incidências desta doença e, também, porque os dados são originários de alguns dos melhores rebanhos em termos de produtividade e utilização de tecnologia para a produção leiteira no Estado.

Corroborando esta informação, as médias individuais de produção de leite na lactação e no dia do controle leiteiro e os respectivos desvios-padrão foram de  $8.370,94 \pm 2.645,00$  kg e  $25,12 \pm 8,15$ , bastante superiores aos valores médios descritos para o País e para o Estado do Paraná. As percentagens de gordura e proteína, com seus respectivos desvios-padrão, foram  $3,42 \pm 0,66\%$  e  $3,14 \pm 0,33\%$ . ALMEIDA (1996), trabalhando com vacas da região de Castro, também no Paraná, encontrou valores ligeiramente inferiores aos descritos e os considerou percentagens baixas.

A idade média da amostra de leite, ou seja, o tempo transcorrido entre a coleta e a análise da amostra foi de  $5,05 \pm 2,29$  dias. Considerando toda a infraestrutura disponível para o serviço de análise de rebanhos leiteiros no Paraná e a



proximidade geográfica das principais bacias leiteiras do Estado com a cidade de Curitiba, sede do PARLPR, este valor é alto.

A idade da vaca em meses e os dias em lactação apresentaram as seguintes médias e desvios-padrão:  $52,56 \pm 25,23$  e  $167,25 \pm 98,36$ , respectivamente.

A duração média da lactação, no arquivo de dados analisados, foi de  $339,49 \pm 77,62$  dias. Seria desejável um valor próximo a 305 dias.

#### 4.2 EFEITOS DE AMBIENTE SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

O resumo da análise de variância para a CCS, ECS L2CS encontra-se na Tabela 11. Os efeitos de mês e ano de controle, separadamente, foram obtidos em uma análise distinta, ao substituírem o efeito único de mês\*ano de controle. Na análise de variância apresentada, entretanto, foi considerado o efeito único, pelo maior valor do  $R^2$  observado.

TABELA 11 – RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS) DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA NO PARANÁ

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		CCS	ECS	L2CS
Frequência de ordenha	1	673.965,1 <sup>ns</sup>	0,0121 <sup>ns</sup>	0,0087 <sup>ns</sup>
Idade da vaca * ordem de lactação	527	58.724.056,0**	481,4305**	488,7002**
Estação de parto	3	744.837,8 <sup>ns</sup>	8,2389**	8,5588**
Ano * mês de controle	57	49.555.670,1**	803,9035**	813,6848**
Dias em lactação	20	9.026.475,9**	137,5177**	144,5525**
Idade da amostra	15	24.546.254,4**	281,3908**	294,7960**
Vaca	77.742	58.100.331,0**	734,3919**	748,3185**
Resíduo		184.827,0	1,1402	1,1636
R <sup>2</sup>		0,4282	0,6444	0,6448
CV (%)		121,0737	25,2468	14,0384

\*\* (P<0,01)

<sup>ns</sup> (P>0,05) não significativo

R<sup>2</sup>: Variação total explicada pelos efeitos incluídos no modelo

#### 4.2.1 FREQUÊNCIA DE ORDENHA

Como já descrito, a metodologia utilizada no presente estudo criou uma variável única para cada lactação, ou seja, considerou cada lactação como um conjunto de dados únicos, independente de outras lactações, inclusive da mesma vaca.

Entretanto, este procedimento não disponibiliza os desvios das classes e, como consequência, nem tampouco podem ser calculadas as estimativas de médias ajustadas de determinados efeitos. Isto porque, a grosso modo, pode-se dizer que o

método considera cada lactação como tendo apenas um único valor dos efeitos de região, rebanho e grau de sangue.

Porém, para a frequência de ordenha (Tabela 11), observa-se que o efeito foi obtido, mas não foi significativo para nenhuma das características estudadas. O SAS obteve este efeito, pois existem no arquivo de origem controles dentro de uma mesma lactação com duas frequências de ordenha, ou seja, houve alteração na frequência de ordenha durante a lactação e o SAS utilizou somente tais dados para a análise de variância. Considerando que estes valores somam uma pequena percentagem do total e não são representativos da realidade expressa pelo arquivo, não foram apresentadas as estimativas de médias ajustadas para este efeito.

#### 4.2.2 IDADE DA VACA AO PARTO, POR ORDEM DE LACTAÇÃO

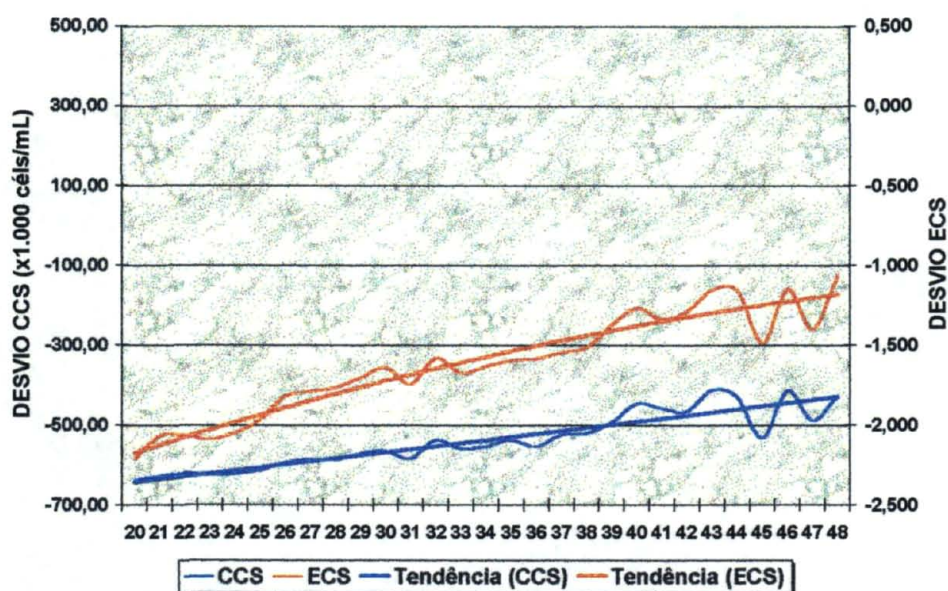
O efeito de idade da vaca ao parto, analisada por ordem de lactação mostrou-se importante fonte de variação para a CCS, para o ECS e para o L2CS ( $P < 0,01$ ), como apresentado na Tabela 11.

Ao se absorver o efeito de vaca, o efeito de ordem de lactação foi incluído, fazendo com que os desvios médios obtidos fossem iguais a zero. Portanto, os desvios médios apresentados foram obtidos em um modelo matemático onde não havia sido incluído o efeito de vaca. Também os valores de quadrados médios e graus de liberdade para este efeito foram obtidos no modelo matemático anterior.

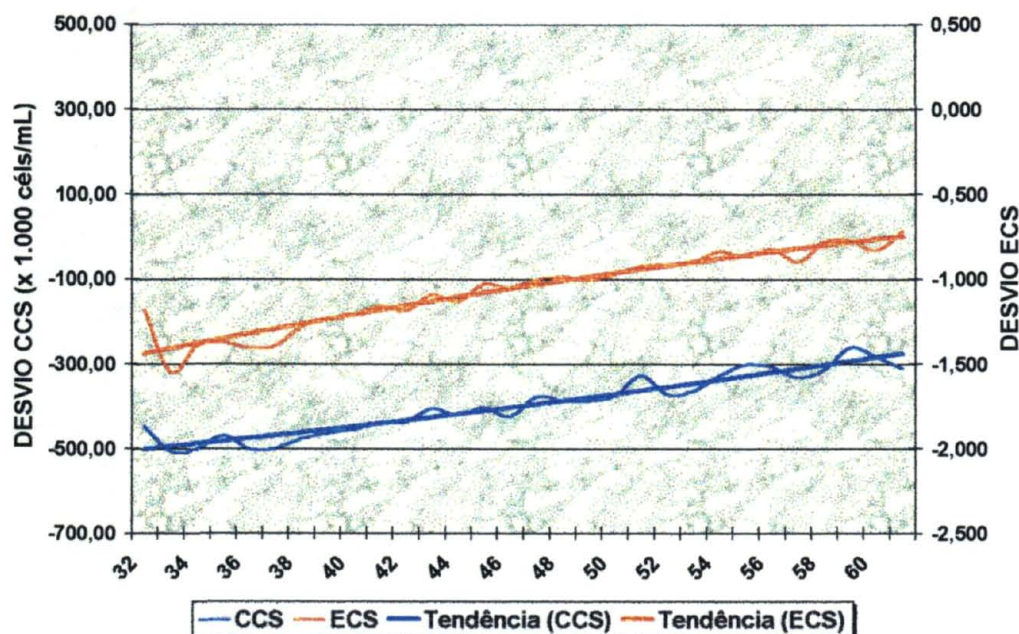
Em razão deste procedimento, são apresentadas apenas tendências da CCS e do ECS em função da idade da vaca ao parto, por ordem de lactação. Nas

Figuras 01, 02, 03, 04 e 05 estão as curvas de CCS e ECS para este efeito, segundo a primeira, segunda, terceira, quarta e quinta a décima ordens de lactação, respectivamente. As figuras são apresentadas como desvio da CCS e do ECS em relação à média da última classe, 144 meses (856.094 células/mL e 5,293, respectivamente).

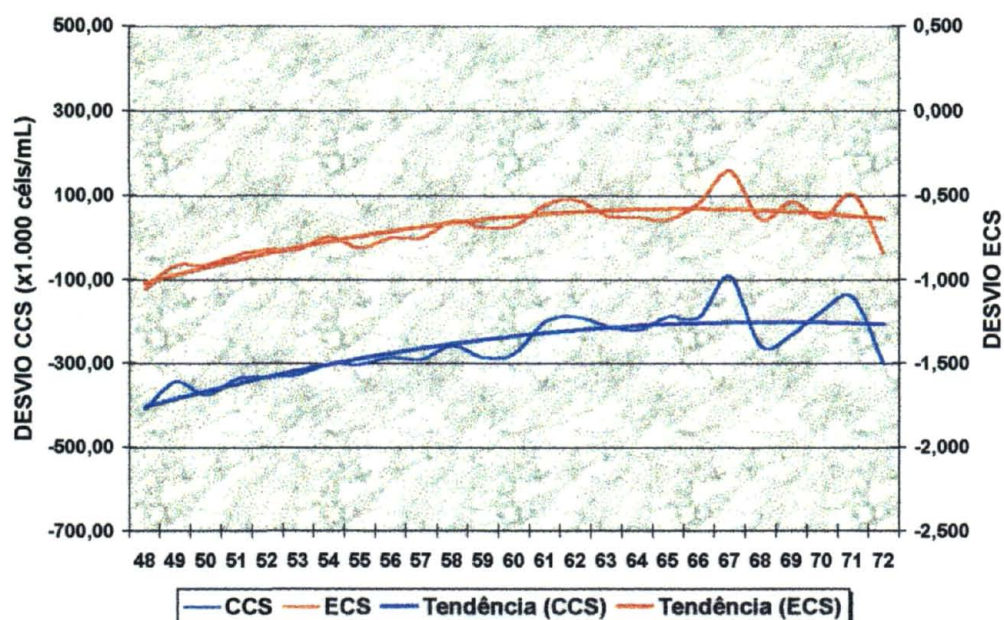
**FIGURA 01 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS EM PRIMEIRA LACTAÇÃO**



**FIGURA 02 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS EM SEGUNDA LACTAÇÃO**

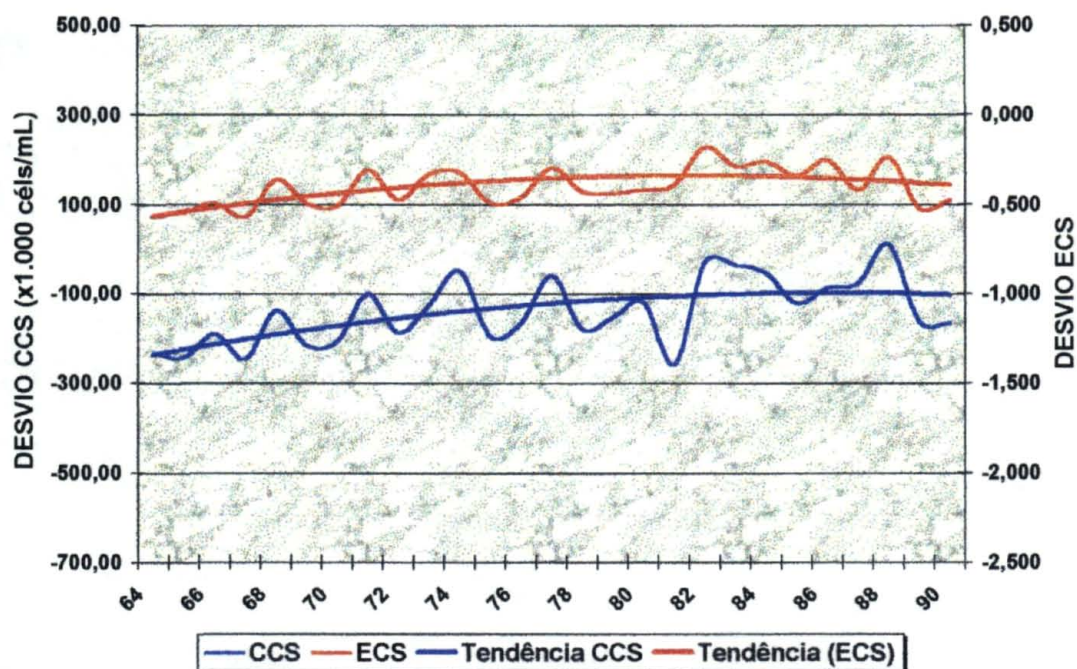


**FIGURA 03 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS EM TERCEIRA LACTAÇÃO**

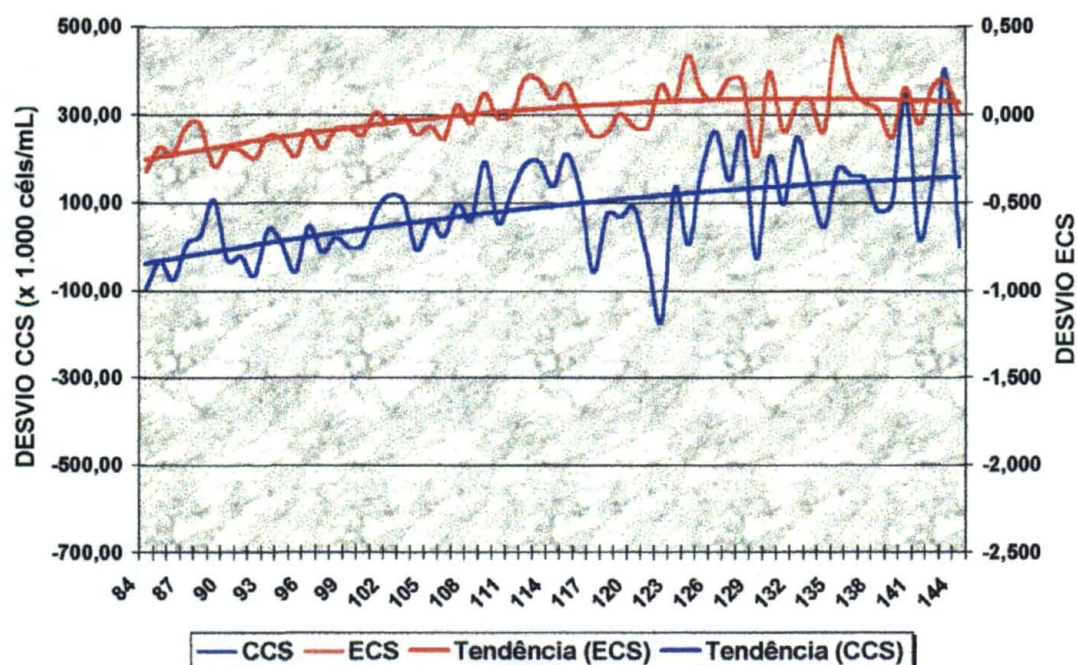




**FIGURA 04 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS EM QUARTA LACTAÇÃO**



**FIGURA 05 – EFEITO DE IDADE DA VACA AO PARTO, EM MESES, SOBRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E SOBRE O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), PARA ANIMAIS DE QUINTA À DÉCIMA LACTAÇÕES**



Pode-se evidenciar, em todas as lactações, a tendência do aumento da CCS e do ECS com o avanço da idade da vaca ao parto, dentro de cada lactação e também entre as lactações. De maneira geral, pode-se dizer que os animais que iniciam a lactação em idade inferior aos demais dentro da mesma classe parecem mostrar menores CCS e ECS e, conseqüentemente, menor incidência de mastite subclínica.

O efeito da ordem de lactação é amplamente pesquisado em outros países e os resultados observados são concordantes com MONARDES et al. (1982), JAARTSVELD et al. (1983) e HARMON (1998), tendo alguns autores trabalhado este efeito como idade da vaca (SALSBERG et al., 1984). Porém, os resultados observados discordam dos achados de SHELDRAKE et al. (1983), que não encontraram significância do efeito de idade da vaca ao parto dentro da mesma lactação, somente entre lactações. Há também divergência com os resultados de DELUYKER et al. (1993), onde não houve significância do efeito de ordem de parição.

Entretanto, a partir da terceira lactação, o ECS mostrou um comportamento distinto, atingindo um pico dentro das classes.

Sabe-se, porém, que a importância da ordem de lactações e ou idade da vaca está diretamente relacionada à presença de infecção na glândula mamária. Quando avaliados animais com cultura bacteriológica do leite negativa, a característica não foi significativa (KENNEDY et al., 1982; MILLER et al., 1991; HARMON, 1998a). Este fato reforça a importância de se considerar estas observações como frutos do aumento da incidência de mastite subclínica nas vacas estudadas.

### 4.2.3 ESTAÇÃO DE PARTO

O efeito de estação de parto foi significativo ( $P < 0,01$ ) no estudo do ECS e do L2CS, conforme dados da Tabela 11, mas foi não significativo para a CCS ( $P > 0,05$ ). Segundo os dados apresentados na Tabela 12, as menores estimativas de médias ajustadas para a CCS foram para vacas paridas no verão (544.000 células/mL) e as maiores, no inverno (568.000 células/mL), mas sem significância estatística. Já para o ECS e o L2CS, as menores estimativas de médias ajustadas foram observadas no inverno, 4,429 e 8,066 respectivamente, e os maiores valores observados na primavera, 4,513 e 8,152, respectivamente (Tabela 12). Valores intermediários foram obtidos no verão (ECS 4,479 e L2CS 8,117) e outono (4,447 e 8,086, respectivamente).

**TABELA 12 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO SCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO A ESTAÇÃO DE PARTO**

Estação de parto	N	CCS (x1.000 céls/mL)	ECS	L2CS
		Médias ajustadas	Médias ajustadas	Médias ajustadas
Verão	143.885	544	4,479	8,117
Outono	186.624	549	4,447	8,086
Inverno	173.770	564	4,429	8,066
Primavera	136.658	568	4,513	8,152
Total	640.937			



DOHOO e MEEK (1982) relataram maiores CCS em vacas que pariram no verão e as menores, em animais paridos no inverno. É preciso considerar a participação de fatores de ordem reprodutiva interagindo com os fatores climáticos e nutricionais na estação de parto. Entretanto, acredita-se que estes últimos efeitos sejam mais marcantes nos efeitos de mês e ano de controle.

É sabido que os principais rebanhos destas bacias leiteiras estavam, em grande parte do período estudado, vinculados às cooperativas leiteiras regionais, que priorizavam a maior produção de leite no inverno, época de maior consumo do produto. Assim, para atingir este objetivo, muitos produtores adotavam a concentração das parições de parte do plantel de novilhas principalmente, nos meses de março a julho, para que estes animais atingissem o pico de produção no período de "cota", ou seja, de melhor remuneração da produção de leite. Com isto, pode ter havido uma pequena influência do estágio de lactação neste efeito de estação de parto.

Uma forma do efeito de estação de parto influenciar o restante da lactação ocorre se o animal for acometido por um quadro de mastite próximo ao momento do parto. Ou seja, com uma maior facilidade de contaminação ambiental, principalmente em épocas de temperatura ambiental e umidade elevadas, e alguns dos mecanismos de defesa do animal diminuídos em sua eficácia, existe uma possibilidade maior da vaca sofrer um processo infeccioso na glândula mamária. Entretanto, acredita-se que este não seja um risco de extrema relevância, pois a maioria dos casos de mastite neste momento é devida a patógenos ambientais que, como já comentado, causam mastite clínica e não mostram maior impacto nos parâmetros de células somáticas.

Por outro lado, se houver alta prevalência de agentes como *S. aureus* e *S. agalactiae* no rebanho, associada a falhas no manejo de ordenha, os animais recém-paridos podem ser acometidos por tais agentes contagiosos, logo após o parto, tendo conseqüências marcantes, então, no restante da lactação.

#### 4.2.4 ANO E MÊS DE CONTROLE

O efeito de ano e mês de controle influenciou significativamente as características estudadas, CCS, ECS e L2CS ( $P < 0,01$ ), como apresentado na Tabela 11. Esta significância ocorreu quando analisado como efeito único (ano\*mês de controle) e quando analisado como efeitos separados (ano de controle e mês de controle), mas com maior  $R^2$  no primeiro modelo estatístico.

Analisando a CCS, o ECS e o L2CS por ano e por mês (Tabelas 13, 14 e 15), durante o período de cinco anos compreendido no estudo, observam-se as maiores médias estimadas para o mês de abril de 1994 (813.000 células/mL, 5,18 e 8,83, respectivamente) e as menores, para agosto daquele mesmo ano (379.000 células/mL, 3,54 e 7,19, referentes a CCS, ECS e L2CS).

De acordo com os dados disponíveis (Tabelas 13, 14 e 15), pode-se constatar que em 1994, as médias de CCS, de ECS e de L2CS variaram em uma amplitude de 434.000 células/mL, 1,64 e 1,64, respectivamente. Em 1998 as mesmas variáveis mostraram diferenças entre valores máximos e mínimos de 162.000 células/mL, 0,59 e 0,61, respectivamente.

TABELA 13 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) SEGUNDO O ANO E O MÊS DE CONTROLE

Mês de controle	N	CCS (x 1.000 células/mL)				
		Médias ajustadas				
		1994	1995	1996	1997	1998
Janeiro	47.198	610		457	556	455
Fevereiro	40.747	609	776	551		490
Março	56.989	730	680	645	540	460
Abril	53.218	813	689	589	547	526
Maio	57.483	602	642	551	542	556
Junho	46.265	592	691	597	594	547
Julho	52.517	466	528	600	569	489
Agosto	60.155	379	645	529	552	435
Setembro	53.379	584	546	511	538	449
Outubro	58.362	562	458	517	544	459
Novembro	59.574	612	622	598	528	409
Dezembro	55.050	485	589	576	473	394
Total	640.937					

TABELA 14 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) SEGUNDO O ANO E O MÊS DE CONTROLE

Mês de controle	N	ECS				
		Médias ajustadas				
		1994	1995	1996	1997	1998
Janeiro	47.198	4,49		3,79	4,27	4,39
Fevereiro	40.747	4,36	4,98	3,70		4,59
Março	56.989	4,77	4,73	4,00	4,35	4,59
Abril	53.218	5,18	4,74	3,97	4,38	4,85
Maio	57.483	4,39	4,66	3,96	4,41	4,93
Junho	46.265	4,47	4,90	4,11	4,55	4,98
Julho	52.517	3,92	4,40	4,17	4,54	4,89
Agosto	60.155	3,54	4,73	4,06	4,52	4,77
Setembro	53.379	4,43	4,78	4,03	4,49	4,85
Outubro	58.362	4,33	4,51	4,10	4,54	4,97
Novembro	59.574	4,37	4,75	4,32	4,58	4,89
Dezembro	55.050	4,02	4,68	4,29	4,35	4,80
Total	640.937					

TABELA 15 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS) SEGUNDO O ANO E O MÊS DE CONTROLE

Mês de controle	N	L2CS				
		Médias ajustadas				
		1994	1995	1996	1997	1998
Janeiro	47.198	8,14		7,42	7,91	8,02
Fevereiro	40.747	8,01	8,62	7,33		8,23
Março	56.989	8,43	8,37	7,64	7,99	8,22
Abril	53.218	8,83	8,38	7,60	8,02	8,50
Maio	57.483	8,04	8,31	7,60	8,05	8,58
Junho	46.265	8,12	8,54	7,75	8,18	8,63
Julho	52.517	7,57	8,04	7,80	8,18	8,53
Agosto	60.155	7,19	8,37	7,69	8,16	8,41
Setembro	53.379	8,08	8,23	7,67	8,13	8,49
Outubro	58.362	7,98	8,15	7,73	8,18	8,62
Novembro	59.574	8,01	8,39	7,96	8,22	8,54
Dezembro	55.050	7,66	8,32	7,93	7,97	8,44
Total	640.937					

Em janeiro de 1995, houve a troca do equipamento de contagem eletrônica Fossomatic 215<sup>®1</sup> pela Somacount 500<sup>®</sup>, visando aumentar o rendimento do Laboratório. A Fossomatic, que utiliza o sistema de fluorescência ótica, necessita uma maior frequência de calibração, que é feita com amostras-padrão oriundas de laboratórios da América do Norte, credenciados para tal pelo FDA (*Food and Drug Administration*), dos Estados Unidos e pelo Ministério da Agricultura do Canadá.

<sup>1</sup> Foss Elettric, Hillerod, Dinamarca.

Ainda, a Somacount tem maior precisão em contagens baixas (abaixo de 50.000 células/mL), mas segundo a IDF (1996a), ambas fornecem resultados aceitáveis em geral, desde que as amostras de leite estejam em condições adequadas.

Os seguintes fatores podem estar sendo fundamentais para a sugerida melhora da confiabilidade das análises de CCS: a melhor qualificação do pessoal de campo, controlando adequadamente os processos de coleta, acondicionamento e transporte das amostras de leite; o treinamento da equipe de profissionais do laboratório, aprimorando os procedimentos de análise e o maior reconhecimento de produtores e técnicos de campo, que reconheceram melhor a importância da coleta de dados e da utilização dos relatórios do PARLPR.

Na Tabela 16, estão os dados referentes às estimativas das médias ajustadas segundo o mês de controle. Para as três variáveis-resposta, os maiores valores foram observados no mês de abril (CCS 641.000 células/mL, ECS 4,66 e L2CS 8,29). No entanto, as menores estimativas das médias ajustadas foram obtidas em dezembro para a CCS (490.000 células/mL) e em agosto para o ECS (4,31) e para o L2CS (7,95). Também foi evidenciada uma tendência a haver maiores valores entre os meses de março a junho, para as três características avaliadas, exceto pela existência de um pico no mês de novembro (545.000 células/mL, ECS 4,56 e L2CS 8,20).

TABELA 16 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO O MÊS DE CONTROLE

Mês de controle	N	CCS (x1.000 céls/mL)	ECS	L2CS
		Médias ajustadas	Médias ajustadas	Médias ajustadas
Janeiro	47.198	553	4,34	7,98
Fevereiro	40.747	600	4,38	8,02
Março	56.989	622	4,53	8,16
Abril	53.218	641	4,66	8,29
Maio	57.483	581	4,49	8,13
Junho	46.265	598	4,60	8,24
Julho	52.517	535	4,41	8,05
Agosto	60.155	501	4,31	7,95
Setembro	53.379	522	4,48	8,12
Outubro	58.362	491	4,46	8,10
Novembro	59.574	545	4,56	8,20
Dezembro	55.050	490	4,40	8,03
Total	640.937			

HARMON (1998b) e OTT et al. (1999) relataram maiores contagens no verão e as menores, no inverno. SALSBERG et al. (1984) também encontraram o mesmo resultado, mas sem significância, justificando que a inclusão da produção de leite como variável independente no modelo reduziria o efeito de sazonalidade. WELLS (1998), nos Estados Unidos, encontrou as maiores contagens em agosto (verão) de 1994 e de 1995 e as menores em abril (primavera) de 1994 e em dezembro (inverno, no hemisfério norte) de 1995.

É importante considerar que o efeito de mês de controle engloba fatores climáticos, como temperatura, onde os extremos são problemáticos para a raça Holandesa, e umidade. Esta combinação de características pode criar condições de desconforto térmico para a raça.

Possíveis influências de manejos geral e alimentar podem estar envolvidas no efeito de mês de controle. Por exemplo, no inverno, em muitos dos rebanhos das bacias leiteiras do sul do Estado, além de boas condições climáticas para os animais (Tabela 05), há condições ótimas de produção de volumoso a partir de forrageiras de inverno.

Particularmente para as regiões de Arapoti, Batavo, Castrolanda e Witmarsum, janeiro é o mês que apresentou as maiores temperaturas médias máximas e precipitações mensais nos últimos dez anos, de acordo com os dados disponíveis nas Tabelas 06 e 07. Assim, forma-se uma condição de calor e umidade, desfavoráveis aos animais da raça Holandesa, aliada a uma tendência de maior aglomeração dos animais quando mantidos a pasto ou recolhidos para o estábulo durante as horas mais quentes do dia. De modo genérico, pode-se esperar que, em alguns rebanhos, os animais estejam mais expostos a condições de sujeira no ambiente. Tal situação é favorável, em princípio, à ocorrência de mastite clínica, cujos patógenos principais são bactérias de origem ambiental, as quais não estão associadas à elevação significativa das mensurações de sanidade da glândula mamária. Assim sendo, considerando as altas médias dos três parâmetros avaliados, CCS, ECS e L2CS, fato que estaria associado a casos de mastite subclínica por bactérias contagiosas e a menor influência de patógenos ambientais



sobre as variáveis avaliadas, não deveriam ser esperadas, necessariamente, estimativas de médias ajustadas superiores para os meses do verão.

Há um fator comum aos dois grupos de meses que apresentaram as maiores estimativas de médias ajustadas, março a junho e novembro, que é a relativa escassez de pastagens em determinados rebanhos, principalmente naqueles onde há criação extensiva ou semi-intensiva e que não puderam ou não conseguiram prover boas reservas de forrageiras conservadas, como silagem de milho e silagens pré-secadas de culturas de inverno. É evidente que somente este aspecto nutricional não é suficiente para justificar a dinâmica observada para o ECS e para o L2CS, mas ele pode ter contribuído.

Sugere-se, para avaliação do estrito efeito de sazonalidade sobre a ocorrência de mastite bovina, a realização de estudos que meçam, em paralelo à CCS, a incidência de casos clínicos da doença, acompanhada pela cultura bacteriológica de amostras de leite.

Na Tabela 17 estão apresentadas as estimativas de médias ajustadas para o efeito de ano de controle sobre as variáveis estudadas. Para a CCS, observa-se uma bem definida tendência de redução da CCS com o passar do tempo, principalmente a partir de 1995, ano que apresentou o maior valor para esta variável (686.000 células/mL).

Analisando-se as estimativas de médias ajustadas para as características de ECS e L2CS, evidencia-se que ambas apresentam os maiores valores em 1995, decrescem em 1996 e voltam a subir nos dois anos seguintes, atingindo um ECS 4,46 e L2CS 8,10, no ano de 1998.

TABELA 17 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO O ANO DE CONTROLE

Ano de controle	N	CCS (x1.000 céls/mL)	ECS	L2CS
		Médias ajustadas	Médias ajustadas	Médias ajustadas
1.994	145.106	656	4,51	8,15
1.995	107.950	686	4,93	8,57
1.996	148.536	572	4,13	7,76
1.997	121.703	495	4,31	7,94
1.998	117.642	374	4,46	8,10
Total	640.937			

Conforme MONARDES (1984), SCHUKKEN et al. (1990) e GODKIN, (1999) houve tendência de redução dos parâmetros de células somáticas com o passar dos anos.

Esta redução pode ser atribuída basicamente à implantação de medidas de controle de mastite, mais especificamente das condições ligadas ao manejo de ordenha, principal momento de transmissão da mastite contagiosa, cujos agentes são as causas freqüentes de elevação da CCS.

Esta consciência pode estar sendo atingida pela maior informação do produtor, ao ser esclarecido das conseqüências que a mastite traz à rentabilidade da atividade, mas na prática ocorre como conseqüência dos programas de pagamento de leite pela qualidade, que vêm sendo praticados pelas indústrias compradoras de leite dos rebanhos em questão. Deste modo, os produtores procuram seguir

algumas das recomendações técnicas para o controle da mastite subclínica. Particularmente nos últimos dois anos, houve uma forte crise econômica no setor, no Estado do Paraná, com o pagamento de preços muitas vezes considerados aquém dos custos pelos técnicos e produtores mais especializados e, conseqüentemente, com desvalorização dos animais. Assim, o produtor fica mais transigente ao descarte de vacas com mastite crônica. Por outro lado, muitos destes produtores em crise vendem um número maior de novilhas de sua própria criação, reduzindo a taxa de descarte e aumentando, portanto, a retenção de vacas com mastite crônica no rebanho.

Sabe-se que as medidas que resultam em aumento da produtividade dos animais também podem estar associadas à redução da CCS. Assim, como tem havido significativos aumentos da produção dos animais mantidos sob controle leiteiro oficial no Estado do Paraná (ALMEIDA, 1996), espera-se uma contribuição indireta para a diminuição das médias ajustadas de CCS.

Diferenças nas condições climáticas, dos manejos nutricional, reprodutivo e geral podem ocorrer ao longo dos tempos, determinando uma variação significativa na CCS. Novamente, menciona-se a crise que o setor vem passando no Paraná, com a redução do número de produtores e a reestruturação do perfil das indústrias de laticínios. As dificuldades econômicas têm um impacto direto na lucratividade do produtor, reduzindo o montante de recursos destinados aos programas de controle de mastite.

Porém, estas observações contribuem apenas parcialmente para explicar os aumentos observados a partir de 1996, para o ECS e para o L2CS.

#### 4.2.5 DIAS EM LACTAÇÃO

Este efeito, também chamado de período ou estágio de lactação, influenciou significativamente ( $P < 0,01$ ), a CCS, o ECS e o L2CS no leite, no presente estudo, de acordo com os dados da Tabela 11.

Para as três variáveis estudadas (Tabela 18), a lactação inicia-se já com altas estimativas de médias ajustadas (516.000 células/mL, ECS 4,42 e L2CS 8,06), mostra uma redução até por volta dos 45 dias, quando atinge, respectivamente, 440.000 células/mL, 4,08 e 7,72, seus valores mais baixos. A partir deste momento, a CCS, o ECS e o L2CS mostram elevação, até os 450 dias de lactação, com 679.000 células/mL, 4,88 e 8,52, respectivamente, as estimativas mais altas.

TABELA 18 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO AS CLASSES DE DIAS EM LACTAÇÃO

Dias em lactação	N	CCS (x1.000 céls/mL)	ECS	L2CS
		Médias ajustadas	Médias ajustadas	Médias ajustadas
4 a 15	19.466	516	4,42	8,06
16 a 30	28.815	444	4,11	7,75
31 a 45	31.113	440	4,08	7,72
46 a 60	30.793	460	4,12	7,75
61 a 75	31.616	480	4,18	7,81
76 a 90	31.233	500	4,24	7,88
91 a 105	31.565	521	4,30	7,94
106 a 120	31.312	528	4,35	7,98
121 a 135	31.297	548	4,40	8,03
136 a 150	30.922	555	4,43	8,06
151 a 165	30.904	568	4,47	8,11
166 a 180	30.315	571	4,50	8,14
181 a 195	30.041	577	4,54	8,18
196 a 210	29.726	586	4,57	8,21
211 a 225	29.057	597	4,61	8,25
226 a 240	28.492	605	4,64	8,28
241 a 255	27.186	611	4,68	8,32
256 a 270	26.264	624	4,71	8,36
271 a 300	43.770	628	4,76	8,40
301 a 330	30.725	651	4,82	8,46
331 a 450	36.325	679	4,88	8,52
Total	640.937			

O ponto mais baixo das curvas dos três parâmetros de células somáticas coincide com o pico das curvas de lactação obtidas por MOLENTO (1995) para animais da raça Holandesa, em controle leiteiro oficial no Estado do Paraná. No início da lactação, as contagens são mais elevadas, mesmo em vacas com cultura bacteriológica negativa, já que o colostro apresenta maior conteúdo celular que o leite (DOHOO e MEEK, 1982). A elevação anormal da CCS pode ocorrer já no colostro, se houver presença de infecção persistente na glândula mamária, no período seco (MAUNSELL et al., 1998). Por estas razões, optou-se pela eliminação dos dados provenientes de controles leiteiros realizados aquém de quatro dias de lactação.

Quando se trabalha com dados de campo, sem realização de cultura bacteriológica das amostras de leite, credita-se o aumento das estimativas das médias ajustadas das variáveis dependentes deste estudo à presença de infecção na glândula mamária. Os resultados obtidos são concordantes com os relatos de SETHAR et al. (1979), DOHOO e MEEK (1982), JAARTSVELD et al. (1983), DELUYKER et al. (1993) e HARMON (1998a). Estes autores comentaram que em pesquisas onde se acompanhou a evolução da CCS com bacteriologia negativa das amostras de leite, não se observou a tendência de elevação da CCS ao transcorrer da lactação. Assim, o efeito do estágio de lactação resume-se à maior incidência de mastite destes animais e, com o passar dos dias, maior a probabilidade dos animais contraírem a doença. Além disto, recorre-se às características dos agentes contagiosos, principalmente o *S. aureus*, que causa quadros subclínicos de longa duração e que pouco responde ao tratamento com antimicrobianos durante a lactação. Ainda, segundo a IDF (1991) e LANGONI (1999), no Brasil, ambos

revisando a etiologia da mastite bovina, o *S. aureus* é o agente de maior frequência de isolamento na mastite bovina.

#### 4.2.6 IDADE DA AMOSTRA

O efeito de idade da amostra de leite (ou também intervalo entre coleta e processamento da amostra) influenciou significativamente ( $P < 0,01$ ) a CCS, o ECS e o L2CS (Tabela 11). De acordo com o exposto na Tabela 19, no dia zero, ou seja, para a análise realizada no mesmo dia da coleta da amostra, as estimativas de médias ajustadas foram de 593.000 células/mL, ECS 4,61 e L2CS de 8,25. Houve uma tendência de elevação destes valores até o dia três após a coleta da amostra, quando atingiram seus valores máximos, 639.000 células/mL, 4,73 e 8,37, respectivamente para a CCS, ECS e L2CS. A partir daí, as três variáveis mostraram queda em seus valores, atingindo 520.000 células/mL, ECS 4,38 e L2CS 8,02 no décimo dia.

TABELA 19 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N) E ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS AJUSTADAS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS) E DO LOGARITMO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (L2CS), SEGUNDO A IDADE DA AMOSTRA DE LEITE, EM DIAS

Idade da amostra (dias)	N	CCS (x1.000 céls/mL)	ECS	L2CS
		Médias ajustadas	Médias ajustadas	Médias ajustadas
0	3.519	593	4,61	8,25
1	24.625	624	4,75	8,40
2	60.486	628	4,73	8,37
3	84.490	639	4,73	8,37
4	79.404	609	4,66	8,30
5	115.304	602	4,63	8,28
6	125.023	585	4,61	8,25
7	82.936	574	4,55	8,19
8	29.213	557	4,49	8,13
9	12.138	541	4,42	8,06
10	9.251	520	4,38	8,02
11	6.141	491	4,23	7,87
12	3.540	498	4,26	7,89
13	2.409	450	3,99	7,60
14	1.609	507	4,21	7,83
15	849	488	4,23	7,86
Total	640.937			

Os presentes resultados contrastam com aqueles obtidos por MONARDES et al. (1996), que embora tenham observado diferenças entre classes de idade da amostra de leite, não observaram significância do efeito.



SETHAR et al. (1979) observaram uma tendência de estabilidade da CCS do dia um ao dia três, mas somente para as vacas de dois anos de idade. KENNEDY et al. (1982) também observaram que a CCS permaneceu praticamente inalterada até o terceiro dia, sem relacionar a idade dos animais. Os resultados do presente trabalho, cuja idade média das vacas foi de cerca de 52 meses (pouco mais de quatro anos), coincidem com os destes autores, ao encontrarem significância para tal efeito. Entretanto, SETHAR et al. (1979) observaram que as vacas com mais de seis anos de idade mostraram queda da CCS desde o dia um. LEE et al. (s.d.) observaram declínio da CCS a partir do dia um.

A elevação da CCS até o terceiro dia, no presente trabalho, pode ser consequência do tempo mais prolongado que as amostras das regiões com maiores CCS levam para chegar até ao laboratório.

É importante observar que somente LEE et al. (s.d.) publicaram resultados com análise no dia zero. De um modo geral, recomenda-se um período de 24 horas antes da análise, para uma boa ação do conservante. E, justamente por esta razão, espera-se resultado no dia um superior ao do dia zero.

Observou-se uma redução, do primeiro ao oitavo dia, de 10,7% nas estimativas das médias ajustadas de CCS para estas classes. KENNEDY et al. (1982) observaram, para o mesmo período, redução de 28% na CCS. Para o ECS, neste intervalo de idade, houve uma redução de 5,5% nos valores médios, abaixo do encontrado por LEE et al. (s.d.) (10,3%). Este últimos autores relataram ECS para o dia um, igual a 2,91 e, para o dia oito, 2,70; ou seja, valores bem abaixo daqueles obtidos neste trabalho. As CCS observadas por KENNEDY et al. (1982) também foram inferiores às deste estudo.

As oscilações observadas para os três parâmetros de células somáticas, a partir de 10 dias de idade da amostra, podem ser resultado do menor número de observações em cada uma destas classes, mas podem indicar uma perda da confiabilidade das análises de amostras de leite com tal tempo de coleta.

Observou-se que até o terceiro dia somente 27,0% das amostras haviam sido analisadas e que até o dia sete, este número elevou-se para 89,8% no arquivo de dados utilizado. MONARDES et al. (1996) relataram que o DHAS (*Dairy Herd Analysis Service*), de Québec, Canadá, analisou 93% das amostras até o terceiro dia após a coleta e que 99,0% foram analisadas em até sete dias de idade.

#### 4.2.7 EFEITO DE VACA

O efeito de vaca influenciou significativamente ( $P < 0,01$ ) a CCS, o ECS e o L2CS (Tabela 11). Este resultado coincide com as observações de SETHAR et al. (1979) e KENNEDY et al. (1982), que afirmaram que as diferenças entre vacas são mais importantes que aquelas que ocorrem devido ao rebanho e a outros efeitos, e refletem a importância dos efeitos genéticos mais efeitos permanentes de ambiente próprios da vaca.

Com a metodologia aplicada, não se dispôs dos efeitos de região, rebanho, grau de sangue e frequência de ordenha. Tais resultados são extremamente interessantes, mas o objetivo do presente é identificar e quantificar os efeitos que interferem com a CCS, o ECS e com o L2CS. Para tanto, visa-se a obtenção de um alto coeficiente de determinação e do menor CV, o que não se conseguiu, quando em modelos preliminares, com a inclusão daqueles efeitos.

Assim, sugere-se a avaliação de outro método de análise para a obtenção dos efeitos de região, rebanho, grau de sangue e frequência de ordenha.

A inclusão do efeito da produção de leite no dia do controle havia mostrado ser significativa, nos estudos preliminares. Porém, acredita-se que esta não seja a melhor metodologia para estudar a relação entre CCS e produção de leite. Ainda mais, tal inclusão gerou uma série de dúvidas, que interferiram não somente com a interpretação dos resultados desta relação, mas também dos resultados dos demais efeitos. Por estas razões, decidiu-se não estudar, por enquanto, a relação entre produção de leite e os parâmetros de células somáticas.

#### 4.2.8 USO DAS TRANSFORMAÇÕES LOGARÍTMICAS DE CÉLULAS SOMÁTICAS

No presente estudo, procurou-se acompanhar a dinâmica da CCS frente aos diversos efeitos avaliados, com o uso de transformações logarítmicas da contagem de células, em razão das vantagens já relatadas que estes métodos trazem.

Foram obtidos os seguintes valores de  $R^2$  e CV (Tabela 11), para a CCS (0,4282 e 121,07%), o ECS (0,6444 e 25,25%) e o L2CS (0,6448 e 14,04%). Em modelo preliminar, com a inclusão dos efeitos que foram utilizados neste modelo (dias em lactação e idade da amostra como covariáveis), mais rebanho, região, grau de sangue, frequência de ordenha e produção de leite no dia do controle (como covariável), foram observados: CCS 0,1364 e 139,48%; ECS 0,3022 e 33,54%; e

para o L2CS: 0,3101 e 18,34%. Portanto, houve uma sensível melhora, sob este aspecto, da análise dos dados.

A diferença entre o  $R^2$  de CCS e das transformações logarítmicas significa que a variação associada aos efeitos estudados foi comparativamente maior para o ECS e L2CS do que para a CCS. Complementando, a variação não explicada, ou seja, o erro, foi comparativamente menor para o ECS e L2CS do que para a CCS.

SHOOK (1982) e SHOOK e RUEGG (1999) relataram que o uso do ECS para os testes de hipóteses é mais preciso do que o uso da CCS, e que os valores do F na análise de variância são aproximadamente o dobro daqueles para a CCS. Os resultados observados apontam para os seguintes valores de F: 4,3518, 8,3831 e 8,4032, respectivamente para a CCS, o ECS e o L2CS, portanto, concordantes com a afirmação daqueles autores. Deste modo, a segurança dos achados neste trabalho para o ECS é maior do que a obtida para a CCS.

Para os programas de avaliação da qualidade do leite, mais especificamente do impacto da elevação dos índices de mastite subclínica sobre a qualidade do leite, o ECS fornece resultados mais precisos do que os resultados de CCS, em função da relação linear que possui com o decréscimo da produção. Já para os programas de avaliação genética, o uso do ECS mostra-se vantajoso, entre outros, pela sua distribuição normal e pela maior homogeneidade da variância entre filhas do mesmo touro e entre vacas do mesmo rebanho.

## 5 CONCLUSÕES

São citadas como conclusões do presente trabalho, a respeito dos efeitos de ambiente sobre os parâmetros de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa no Paraná:

- a) A produtividade dos animais em controle leiteiro oficial pelo PARLPR, avaliados neste trabalho, é bastante elevada (8.370 kg leite/lactação/vaca, 25,12 kg leite/vaca/dia), principalmente se comparada às médias descritas para o País e mesmo para o Estado do Paraná. Porém, as interpretações dos resultados aqui apresentados restringem-se tão somente aos animais em questão, pois a realidade da maioria dos rebanhos produtores de leite no Estado é distinta daquela do conjunto de dados analisados;
- b) As médias reais observadas para a CCS (556.626 células/mL), para o ECS (4,461) e para o L2CS (8,105) são elevadas e demonstram o alto grau de incidência de infecções na glândula mamária nos animais em questão. Isto é agravado pelo fato dos dados serem oriundos de vários dos melhores rebanhos nas suas respectivas regiões;

- c) O efeito de idade da vaca ao parto, por ordem de lactação, mostrou-se significativo sobre as três características estudadas, ficando evidente que há uma elevação dos parâmetros com o avançar da idade dentro de uma lactação e entre lactações. Este aumento, segundo a literatura, é devido ao aumento da incidência de infecções intramamárias. Muita atenção deve ser dada pelos produtores aos animais de primeiro parto, empenhando esforços para que estes animais, sadios, não venham a se infectar;
- d) O efeito de estação de parto não foi significativo sobre a CCS, mas sim sobre o ECS e o L2CS. Os menores valores destas transformações logarítmicas foram observadas no inverno e os maiores, na primavera. Embora haja uma maior predisposição à ocorrência de mastite próximo ao parto, durante toda a lactação a vaca está sujeita a contrair a doença;
- e) Os efeitos de mês e ano de controle foram importantes fontes de variação sobre a CCS, o ECS e o L2CS. As maiores médias foram observadas no mês de abril e as menores, em dezembro para a CCS e em agosto, para o ECS e o L2CS. Houve uma tendência de redução da CCS com o passar dos anos, mas o ECS e o L2CS mostraram elevação a partir de 1996. Porém, era esperada uma redução nos três parâmetros, pela melhora das medidas de controle de mastite nos rebanhos, principalmente em função dos programas de pagamento de leite por qualidade;

- f) O efeito de estágio de lactação foi significativo sobre as três características avaliadas, mostrando médias altas já logo após o parto, o que pode ser fisiológico, pelo maior conteúdo celular do colostro ou patológico, com vacas mostrando infecções crônicas, de lactações anteriores ou adquiridas no período seco, ou mesmo, com mastite já no início da lactação. Houve uma queda nas médias dos três parâmetros, coincidente ao pico de lactação, seguida por elevação durante todo o restante da lactação, fruto de processos infecciosos na glândula mamária, segundo a literatura;
- g) O efeito da idade da amostra foi importante fonte de variação sobre as características avaliadas. Houve uma elevação até o terceiro dia, seguida por queda até os quinze dias. Assim, recomenda-se que as amostras que cheguem ao laboratório com mais de dez dias após a coleta não sejam analisadas para a CCS.
- h) O efeito de vaca, que inclui componente genético, foi significativo e merece ser incluído em modelos que avaliem fatores que influenciam a CCS, o ECS e o L2CS;
- i) O ECS mostrou maior precisão nas análises estatísticas que a CCS, com maior coeficiente de determinação e menores CV e erros-padrão, traduzindo de maneira mais segura a realidade da população de vacas estudada. Assim, recomenda-se que o ECS seja utilizado, ao menos em paralelo à CCS, nas estatísticas sobre células somáticas no Estado do Paraná.

## ANEXO: TABELAS

TABELA 01 – PRODUÇÃO TOTAL DE LEITE DOS PRINCIPAIS PAÍSES, EM 1998 E 1999 E A EVOLUÇÃO NO PERÍODO

Países	1998 <sup>1</sup>	1999 <sup>2</sup>	Evolução (%)
Estados Unidos	71,37	72,65	1,8
Índia	35,50	36,00	1,4
Rússia	34,00	33,00	-3,0
Alemanha	28,50	28,50	0,0
França	24,70	24,50	-0,8
Brasil	21,63	22,50	4,0
TOTAL	384,89	387,47	0,7

SEAB-DERAL (1999)

<sup>1</sup> Estimativa

<sup>2</sup> Previsão



TABELA 02 – ESTIMATIVA DAS DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO DE LEITE POR LACTAÇÃO ASSOCIADAS À VARIAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) E DO ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS)

ECS médio da lactação	CCS média da lactação (x 1.000 células/mL)	Diferenças na produção de leite	
		1ª lactação	2ª ou + lactações
		(kg/305 dias)	
0	12,5	-	-
1	25	-	-
2	50	-	-
3	100	- 90	- 180
4	200	- 180	- 360
5	400	- 270	- 450
6	800	- 360	- 720
7	1.600	- 450	- 900

(PHILPOT e NICKERSON, 1992)

TABELA 03 – RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS), O ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), O CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT), O WISCONSIN MASTITIS TEST (WMT) E ESTIMATIVAS DE PERDA DE PRODUÇÃO DE LEITE

Escore CMT	WMT	ECS	CCS	Perdas de produção	Estimativa da perda
	(mm)		(x1.000 céls/mL)	(%)	(kg/vaca/ano)
Negativo	2	3,0	100	3	180
	5	4,0	200	6	360
Traços	8	4,6	300	7	450
	10	5,0	400	8	550
	12	5,3	500	9	590
1	14	5,6	600	10	630
	16	5,8	700		680
	18	6,0	800	11	725
	20	6,2	900		750
	22	6,3	1.000	12	770
	25	6,6	1.200	> 12	> 770

(PHILPOT e NICKERSON, 1992)

TABELA 04 – ESCORE LINEAR E A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Escore linear	CCS (x 1.000 células/mL)				
	Ponto médio		Variação		
0	12,5		0	a	17
1	25		18	a	34
2	50		35	a	70
3	100		71	a	140
4	200		141	a	282
5	400		283	a	565
6	800		566	a	1.130
7	1.600		1.131	a	2.262
8	3.200		2.263	a	4.525
9	6.400		acima	de	4.525

SHOOK (1982)

**TABELA 05 – ALTITUDE E CLIMA DE ESTAÇÕES METEOROLÓGICAS DO IAPAR CORRESPONDENTES ÀS BACIAS LEITEIRAS AVALIADAS NESTE ESTUDO**

Bacia leiteira	Estação meteorológica	Altitude (m)	Clima <sup>1</sup>
Arapoti	Telêmaco Borba	768	Cfb
Batavo, Castrolanda, Witmarsum	Ponta Grossa	880	Cfb
Clac	Pinhais	930	Cfb
Norte	Londrina	585	Cfa
Oeste, Sudoeste	Cascavel	660	Cfa

(IAPAR, 1999)

<sup>1</sup> Segundo a classificação de Köppen

**TABELA 06 – TEMPERATURAS MÉDIAS MÁXIMAS E MÍNIMAS EM ESTAÇÕES METEOROLÓGICAS DO IAPAR CORRESPONDENTES ÀS BACIAS LEITEIRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO**

Bacia leiteira	Estação meteorológica	Média máxima		Média mínima	
		Temp. (° C)	Mês	Temp. (° C)	Mês
Arapoti	T. Borba	29,0	Janeiro	8,1	Julho
Batavo, Castrolanda, Witmarsum	Ponta Grossa	27,6	Janeiro	9,1	Julho
Clac	Pinhais	26,2	Fevereiro	8,3	Julho
Norte	Londrina	29,7	Fevereiro	11,5	Julho
Oeste, Sudoeste	Cascavel	28,6	Janeiro	11,2	Julho

(IAPAR, 1999)

**TABELA 07 – PRECIPITAÇÕES PLUVIOMÉTRICAS MÉDIAS MÁXIMAS, MÍNIMAS E TOTAL EM ESTAÇÕES METEOROLÓGICAS DO IAPAR CORRESPONDENTES ÀS BACIAS LEITEIRAS AVALIADAS NESTE ESTUDO**

Bacia leiteira	Estação meteorológica	Média máxima		Média mínima		Total (mm)
		Precip. (mm)	Mês	Precip. (mm)	Mês	
Arapoti	T. Borba	203,1	Janeiro	68,3	Agosto	1640,0
Batavo, Castrolanda, Witmarsum	Ponta Grossa	188,2	Janeiro	79,9	Agosto	1545,0
Clac	Pinhais	193,1	Janeiro	71,6	Agosto	1426,1
Norte	Londrina	223,2	Dezembro	52,9	Agosto	1645,1
Oeste, Sudoeste	Cascavel	142,4	Janeiro	72,8	Agosto	1970,9

(IAPAR, 1999)

**TABELA 08 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS, NÚMERO DE OBSERVAÇÕES UTILIZADAS E NÚMERO E PERCENTAGENS DE OBSERVAÇÕES ELIMINADAS PELAS RESTRIÇÕES APLICADAS AO ARQUIVO DE DADOS ORIGINAL**

Observações	Rebanhos	Vacas		Controles mensais	
Originais	588	52.432		993.839	
Utilizadas	378	40.333		640.937	
Eliminadas	210	(35,71%)	12.099	(23,07%)	352.902 (35,50%)

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCBHR. **Gado Holandês**: Encarte Controle Leiteiro, São Paulo, n. 487, p. 154, set/out. 1999.
- ALBERTON, L.R. **Controle de mastite em vacas leiteiras com bacterina de *Staphylococcus aureus* isolados do rebanho, aplicada repetidamente durante a lactação**. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- ALI, A.K.A.; SHOOK, G.E. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 63, n. 3, p. 487-490, 1980.
- ALLORE, H.G.; OLTENACU, P.A.; ERB, H.N. Effects of season, herd size, and geographic region on the composition and quality of milk in the Northeast. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 80, n. 11, p. 3040-3049, 1997.
- ALMEIDA, R. **Estudo dos efeitos de meio ambiente e genéticos sobre as características produtivas de vacas da raça Holandesa na região da Batavo, Estado do Paraná**. Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- AULDIST, M.J.; COATS, S.; ROGERS, G.L.; McDOWELL, G.H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Austr. J. Exp. Agric.**, v. 35, n. 4, p. 427-436. 1995.

- AULDIST, M.J.; COATS, S.J.; SUTHERLAND, B.J.; HARDHAM, J.F.; McDOWELL, G.H.; ROGERS, G.L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **J. Dairy Res.**, v. 63, n. 3, p. 377-386, 1996a.
- AULDIST, M.J.; COATS, S.J.; SUTHERLAND, B.J.; MEYES, J.J.; McDOWELL, G.H.; ROGERS, G.L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. **J. Dairy Res.**, v. 63, n. 2, p. 269-280, 1996b.
- AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Austr. J. Dairy Technol.**, v. 53, n. 1, p. 28-36. 1998.
- BARBANO, D.M.; RASMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 74, p. 369-388, 1991.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.G.M.; GALLIGAN, D.T.; BEIBOER, M.L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 80, n. 8, p. 1592-1599, 1997.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**, 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263 p.
- BOOTH, J.M. Milk quality and mastitis control in the United Kingdom and European Union. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (35. : 1996 : Nashville). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1996. p. 33-41.
- BOOTH, J.M.; HARDING, F. Milk composition in herds with high and low mastitis cell counts. **Brit. Soc. of Anim. Prod. Occasional Publication**, n. 9, 1984.

- BRAMLEY, A.J.; CULLOR, J.S.; ERSKINE, R.J.; FOX, L.K.; HARMON, R.J.; HOGAN, J.S.; NICKERSON, S.C.; OLIVER S.P.; SMITH, K.L.; SORDILLO, L.M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4 ed., Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.
- BRASIL. Portaria n. 56, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, de 7 de dezembro de 1999. Submete à consulta pública os Regulamentos Técnicos discriminados, em conformidade aos Anexos desta Portaria. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 234, seção 1, p. 34-42, 8 dez. 1999.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B.; GARINO JR, F.; BENITES, N.R.; HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Napgama**, São Paulo, n. 2, p. 16-20, 1999.
- COULON, J.B.; PRADEL, P.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Effect of extreme walking conditions for dairy cows on milk yield, chemical composition, and somatic cell count. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 81, n. 4, p. 994-1003, 1998.
- DELUYKER, H.A. Milk yield fluctuations associated with mastitis. In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSOM; HILL, A.W. **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Gent: Vlaams, 1991. p. 207-213.
- DELUYKER, H.A.; GAY, J.M.; WEAVER, L.D. Interrelationships of somatic cell count, mastitis, and milk yield in a low somatic cell count herd. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 76, n. 11, p. 3445-3452, 1993.
- DOHOO, I.R.; MEEK, A.H. Somatic cell counts in bovine milk. **Can. Vet. J.**, v. 23, p. 119-125, 1982.

- EMANUELSON, U.; FUNKE, H. Effect of milk yield on relationship between bulk milk somatic cell count and prevalence of mastitis. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 74, n. 8, p. 2479-2483, 1991.
- EMANUELSON, U.; WEVER, P. Potential of differential somatic cell counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows. **Acta Vet. Scand.**, v. 30, p. 475-481, 1989.
- ERSKINE, R.J. Nutrition and mastitis. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 551-561, 1993.
- FOX, P.F. **Developments in dairy chemistry - 3. Lactose and minor constituents**. Essex: Elsevier, 1985. 480 p.
- HARDING, F. **Milk quality**. 1 ed., Glasgow: Blackie, 1995. 166 p.
- GODKIN, A. Monitoring and controlling mastitis: progress in Ontario. In: NAT. MAST. COUNCIL REG. MEET. (1999 : Waterloo). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1999. p. 1-9.
- HARMON, R.J. Fatores que afetam as contagens de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE (1. : 1998 : Curitiba). **Anais...** Curitiba, 1998a.
- HARMON, R.J. Influence of copper on somatic cell counts and mastitis In: SE. DAIRY HERD MANAG. CONFERENCE (Macon : 1999) **Proceedings...** Athens, 1999. <http://www.ces.uga.edu/Agriculture/asdsvm/Dairyscience/procdng99.htm>. 11.01.00.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cells counts. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.



HARMON, R.J.; RENEAU, J.K. Factors affecting somatic cell counts in milk. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (32. : 1993 : Arlington) **Proceedings...**, Madison: Nat. Mast. Council, 1993, p. 48-57.

HARMON, R.J. Somatic cell counts: myths vs reality. In: NAT. MAST. COUNCIL REG. MEET. (37. : Bellevue : 1998). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1998b, p. 40-50.

HARMON, R.J.; TORRE, R.M. Copper and zinc: do they influence mastitis? In: NAT. MAST. COUNCIL NAC. MEET. (33. : Orlando : 1994) **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1994, p. 54.

HILL, A.W. Somatic cells: friends or foes? In: BURVENICH, C.; VANDEPUTTE-VAN MESSOM; HILL, A.W. **New insights into the pathogenesis of mastitis**. Gent: Vlaams, 1991. p. 217-230.

HOLDAWAY, R.J.; HOLMES, C.W.; STEFFERT, I.J. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows. Part 1. The effects of bacterial infection, stage of lactation and age of cow on eight parameter in foremilk from individual quarters, with an initial study of differences between milk fractions. **Austr. J. Dairy Technol.**, v. 51, n. 2, p. 64-71. 1996a.

HOLDAWAY, R.J.; HOLMES, C.W.; STEFFERT, I.J. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows. Part 2. The discriminative ability of eight parameters in foremilk from individual quarters of cows. **Austr. J. Dairy Technol.**, v. 51, n. 2, p. 72-78. 1996b.

HOLMES, C.W.; KAMOTE, H.; MACKENZIE, D.D.S.; MOREL, P.C.H. Effects of a decrease in milk yield, caused by once-daily milking or by restricted feeding, on the somatic cell count in milk from cows with or without subclinical mastitis. **Austr. J. Dairy Technol.**, v. 51, n. 1, p. 8-11. 1996.

HUNT, E.; ANDERTON, N.K. Update on bovine mastitis: Conversion of somatic cell count to somatic cell score. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 579-580, 1993.

IAPAR. **Cartas climáticas do Paraná**, Londrina: IAPAR, 1999.

IDF. Environmental influences on bovine mastitis. **Int. Dairy Fed. Ann. Bull.**, Brussels, n. 217, 1987.

IDF. Mastitis control, results of questionnaire 1089/A. **Int. Dairy Fed. Ann. Bull.**, Brussels, n. 256, 1991.

IDF. New systems for somatic cell counts. **Mastitis newsletter**, Brussels, n. 21, p.16-17, 1996a.

IDF. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. **Mastitis newsletter**, Brussels, n. 21, p.7-9, 1996b.

IDF. Stress and somatic cell counts. **Mastitis newsletter**, Brussels, n. 112, 1990.

JAARTSVELD, F.H.J.; PUFFELE, E. van; OSKAM, J.; TIELEN, M.J.M., VERSTEGEN, M.W.A.; ALBERS, G.A.A. Somatic cell counts in milk of dairy cows in relation to stage of lactation, age, production level and presence of pathogens. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 37, p.79-90, 1983.

- JANK, M.S.; FARINHA, E.M.M.Q.; GALAN, V.B. **O agribusiness do leite no Brasil**. São Paulo: Milkbuzz, 1999. 108 p.
- JONES, G.M.; PEARSON, R.E.; CLABAUGH, G.A. Relationships between somatic cell counts and milk production. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 67, n. 8, p. 1823-1831, 1984.
- KENNEDY, B.W.; SETHAR, M.S.; TONG, A.K.W.; MOXLEY, J.E.; DOWNEY, B.R. Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 65, n. 2, p. 275-280. 1982.
- KLEI, L.R.; LYNCH, J.M.; BARBANO, D.M.; OLTENACU, P.A.; LEDNOR, A.J.; BRANDLER, D.K. Influence of milking three times a day on milk quality. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 80, n. 3, p. 427-436. 1997.
- KLEI, L.R.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, 1998.
- LANGONI, H. Complexidade etiológica da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITES (3. : 1999 : Botucatu). **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 1999, p. 3-18.
- LARANJA DA FONSECA, L.F. **Estudo da prevalência da mastite bovina e sua relação com práticas de manejo, higiene e terapia em fazendas produtoras de leite tipo B no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1992. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Esalq / Universidade de São Paulo.
- LARANJA DA FONSECA, L.F. Vamos ser, algum dia, exportadores de leite? **Imagem Rural Leite**, São Paulo, n. 42, p. 22-28, 1997.

- LARANJA DA FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V.; AMARO, F.R.; RODRIGUES, P.M.; CARVALHO, J.C.C. Effect of temperature and rainfall on the occurrence of clinical and subclinical mastitis in southeast region of Brazil. In: NAT. MAST. COUNCIL NAT. MEET. (37. : Bellevue : 1998) **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1998, p. 316-318.
- LEE, K.L.; DAYTON, K.P.; KROLL, G.; MCGILLIARD, M.L. Effects of preservative, storage time and storage temperature on milkfat percent, protein percent and somatic cell count determination. [s.l. : s.n.], [s.d.].
- LESLIE, K.E.; GODKIN, M.A.; SCHUKKEN, Y.H.; SARGEANT, J.M. Milk quality and mastitis control in Canada: progress and outlook. In: NAT. MAST. COUNCIL NAT. MEET. (35. : 1996 : Nashville). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1996. p. 19-30.
- MA, Y.; RYAN, C; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN, M.A.; BOOR, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 83, n. 2, p. 264-274, 2000.
- MAUNSELL, F.P.; MORIN, D.E.; CONSTABLE, P.D.; HURLEY, W.L.; McCOY, G.C.; KAKOMA, I.; ISAACSON, R.E. Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 81, n. 5 , p. 1291-1299. 1998.
- METTIFOGO, E.; MULLER, E.E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Estratégias de controle da mastite bovina utilizando como parâmetros a contagem de células somáticas e o perfil microbiológico. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITES (3. : 1999 : Botucatu). **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 1999, p. 151.

- MILLER, R.H.; NORMAN, H.D.; WIGGANS, G.R.; WRIGHT, J.R. National survey of herd average somatic cell counts on DHI test days. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (38. : 1999 : Arlington). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1999. p.161-162.
- MILLER, R.H.; PAAPE, M.J.; FILEP R; LINK, S. Flow cytometric analysis of neutrophils in cows' milk. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 12, p. 1975-1979, 1993.
- MILLER, R.H.; PAAPE, M.J.; FULTON, L.A. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 74, n. 11, p. 3782-3790, 1991.
- MOHR, P. Around the world: SCC in Canada, New Zealand and the UK. **Dairy Today**, March 1998. <http://www.farmjournal.com/magazines/articles.cfm?art21.03.99>.
- MOLENTO, C.F.M. **Estudo das curvas de lactação de vacas da raça Holandesa no Paraná**. Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- MONARDES, H.G. **Genetic and phenotypic parameters of lactation cell counts in different lactations of Holstein cows**. Montreal, 1984. Thesis (Doctor of Philosophy), McGill University.
- MONARDES, H.G.; HAYES, J.F. Genetic and phenotypic statistics of lactation cell counts in different lactations of Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 68, n. 6, p. 1449-1455, 1985.
- MONARDES, H.G.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E. Genetic and environmental effects on cell counts on a lactation basis in Ayrshire cows. **Dep. Anim. Sci. Res. Rep.**, 1982.

- MONARDES, H.G.; MOORE, R.K.; CORRIGAN, B.; RIOUX, Y. Milk preservatives under different systems of sample storage in Quebec, Canada. **J. Food Prot.**, v. 59, n. 2, p. 151-154. 1996.
- MOORE, R.K.; KENNEDY, B.W.; BURNSIDE, E.B.; MOXLEY, J.E. Relationships between speed of milking and somatic cell count and production in Holsteins. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 63, p. 781-789, 1983.
- MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Aust. J. Dairy Tech.**, v. 39, p. 7-16, 1984.
- NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington: National Academy Press, 1989. p. 2-51.
- NMC. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison: National Mastitis Council, 1999. 222 p.
- O'SULLIVAN, C.A.; JOYCE, P.J.; SLOAN, T. Capture immunoassay for the diagnosis of bovine mastitis using a monoclonal antibody for polymorphonuclear granulocytes. **J. Dairy Res.**, v. 59, p. 123-133, 1992.
- OTT, S.L.; WELLS, S.J.; SMITH, M.A. Bulk tank somatic cell counts of U.S. supply, 1997. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (38. : 1999 : Arlington). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1999. p.154-155.
- PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A.; MACHADO, P.F. Determinação das equações de regressão da porcentagem de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite em função da contagem de células somáticas. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITES (3. : 1999 : Botucatu). **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 1999a, p. 146.

- PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A.; MACHADO, P.F.; MORAIS, A.M. Efeito do período de realização da ordenha sobre a produção de leite, contagem de células somáticas, porcentagens de gordura, proteína, lactose e sólidos totais. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITES (3. : 1999 : Botucatu). **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 1999b, p. 150.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack**. Naperville: Babson Bros. 1992. 150 p.
- POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 71, p. 1720-1727, 1988.
- RIBAS, N.P. A hora da CCS: contagem de células somáticas assegura a qualidade do leite. **Produtor Parmalat**, São Paulo, n. 18, p. 26-30, 1998.
- RIBAS, N.P. A importância da CCS para a qualidade do leite. **Glória Rural**, Rio de Janeiro, p. 12-17, set. 1999a.
- RIBAS, N.P. A mastite e a contagem de células somáticas. **Revista Batavo: Encarte Técnico**, Castro, n. 60, p. 4-6, 1996.
- RIBAS, N.P. Análise de rebanho leiteiro: mais informações, melhor gerenciamento. São Paulo: **Balde Branco**, São Paulo, p. 28-35, abr. 1999b.
- RIBAS, N.P.; VEIGA, D.R.; HORST, J.A. **Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná: Instrumento de Gerenciamento do Seu Rebanho**. Curitiba: PARLPR / APCBRH, 1997. 14 p.

RODRIGUES, P.H.M.; SANTOS, M.V.; LARANJA DA FONSECA, L.F.; PEIXOTO JR, K.C.; ANDRADE, S.J.T.; AMARO, F.R.; LUCCI, C.S. Effect of milk somatic cell count on the response of dairy cows pretreated with recombinant bovine somatotropin. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (37 : 1999 : St. Louis). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1998. p.314-315.

SALSBERG, E.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W. Somatic cell counts: associated factors and relationship to production. **Can. J. Comp. Med.**, v. 48, p. 251-257, 1984.

SAS System for Linear Models. 3. ed., Cary: SAS Institute, 1991.

SCHUKKEN, Y.H.; BUURMAN, J.; BRAND, A.; VAN DER GEER, D; GROMMERS, F.J. Population dynamics of bulk milk somatic cell counts. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 73, n. 5, p. 1343-1350, 1990.

SEAB – DERAL. **Acompanhamento da situação agropecuária no Paraná.** Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural, v. 25, 1999.

SETHAR, M.S.; KENNEDY, B.W.; TONG, A.K.W.; MOXLEY, J.E.; DOWNEY, B.R. Genetic and environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. In: AMERICAN DAIRY SCIENCE ANNUAL MEETING (Logan : 1979). **Proceedings...** Madison: Am. Dairy Sci. Assoc., 1979.

SHELDRAKE, R.F.; HOARE, R.J.T.; MCGREGOR, G.D. Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cells, electrical conductivity, and serum albumin in milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 66, p. 542-547, 1983.

SHOOK, G.E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (21 : 1982 : Pennsylvania). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1982. p.150-166.



- SHOOK, G.E.; RUEGG, P. Geometric mean somatic cell counts: what they are; what they do. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (38 : 1999 : Arlington). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1999. p. 93-100.
- SMITH, K.L. Recommendations for presentation of mastitis-related data. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 321, p. 6-25, 1997.
- SMITH, K.L. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. **Int. Dairy Fed. Mastitis Newsl.**, Brussels, n. 21, 1996.
- SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Milk quality – a worldwide perspective. In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (37 : 1998 : St. Louis). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1998. p. 3-9.
- SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K; DeROSA, D. Symposium: Bovine Immunology. Immunobiology of the mammary gland. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 80, p. 1851-1865, 1997.
- STELWAGEN, K; LACY-HULBERT, S.J. Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. **Am. J. Vet. Res.**, v. 57, n. 3, p. 902-905, 1996.
- THIERS, F.O.; COSTA, E.O.; GARINO JR, F.; BENITES, N.R. Conteúdo celular do leite de bovinos em diferentes fases da lactação. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITES (3. : 1999 : Botucatu). **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 1999. p. 145.
- VALDE, J.P.; HIRD, D.W.; THURMOND, M.C.; OSTERAS, O. Comparison of ketosis, clinical mastitis, somatic cell count, and reproductive performance between free stall and tie stall barns in Norwegian dairy herds with automatic feeding. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, n. 2, p. 181-192, 1997.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**, New York: J. Wiley and Sons, 1984. 467p.

WELLS, S.J.; OTT, S.L. What is the current milk quality in the US? In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET. (37 : 1998 : St. Louis). **Proceedings...** Madison: Nat. Mast. Council, 1998. p.10-18.